UNIVERSITÉ DE STRASBOURG FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE SCOLAIRE 1940-1941. N° 287

RECHERCHES SUR LA CARACTÉRISATION CULTURALE DES BACTÉRIES DU GROUPE COLI-TYPHIQUE

THÈSE

29 JUIL 1941

Présentée et soutenue publiquement le
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le grade de Docteur de l'Université
(Mention Pharmacie)

PAR

Pawel SIMEONOV ALEXANDROV
Pharmacien

Examinateurs de la Thèse : M. A. SARTORY, Doyen, Président ; M. P. CORDIER, Professeur ; M. Ch. LAPP, Professeur } Juges

CLERMONT-FERRAND
J. GEORGES-LANG, 28, Rue Morel-Ladeuil
—
1941

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE SCOLAIRE 1940-1941. N° 287

RECHERCHES SUR LA CARACTÉRISATION CULTURALE DES BACTÉRIES DU GROUPE COLI-TYPHIQUE

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le 29 JUIL 1941
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le grade de Docteur de l'Université
(Mention Pharmacie)

PAR

Pawel SIMEONOV ALEXANDROV
Pharmacien

Examinateurs de la Thèse : M. A. SARTORY, Doyen, Président ; M. P. CORDIER, Professeur ; M. Ch. LAPP, Professeur — Juges

CLERMONT-FERRAND
J. GEORGES-LANG, 28, RUE MOREL-LADEUIL

—

1941

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. SARTORY, *Doyen*, C. ❋, I. ⚱, C. ⚕.
VOLMAR, *Assesseur*, ❋, I. ⚱.
MARANDON, *Secrétaire*, ❋, ⚕, ⚕, ⚱.

DOYEN HONORAIRE

M. JADIN, O. ❋, I. ⚱, ⚕.

PROFESSEURS

MM.	A. SARTORY, C. ❋, I. ⚱, C. ⚕.	Bactériologie
	LAVIALLE, ❋, I. ⚱, ⚕	Botanique
	VOLMAR, ❋, I. ⚱	Chimie organique
	GUILLAUME, O. ❋, ⚕, I. ⚱, ⚕.	Pharmacie galénique
	LAPP, I. ⚱	Chimie analytique
	CORDIER, ⚱	Pharmacie chimique
	R. SARTORY, ⚱ ⚕	Matière médicale

MAITRE DE CONFÉRENCE

M. DUQUENOIS ..... Toxicologie.

PROFESSEUR HONORAIRE

M. JADIN, O. ❋, I. ⚱, ⚕.

COURS COMPLÉMENTAIRES

MM.	A. SARTORY	Hygiène
	LAVIALLE	Hydrologie
	VOLMAR	Chimie minérale
	GUILLAUME	Zoologie
	LAPP	Physique
	PRÉLOT	Législation et Déontologie
	CORDIER	Chimie biologique
	R. SARTORY	Cryptogamie
	DUQUENOIS	Toxicologie

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

M.	COLLARD, ⚕, I. ⚱	Chimie pharmaceutique
Mme	LALLEMAND	Chimie et Physique
MM.	LEDOUX	Bactériologie et Parasitologie
	JÆGER	Histoire naturelle

A MON MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE :

MONSIEUR A. SARTORY

DOYEN DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG
PROFESSEUR DE BACTÉRIOLOGIE
A LA FACULTÉ DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
COMMANDEUR DE LA LÉGION D'HONNEUR

Expression de notre gratitude, de notre admiration et de notre dévouement.

A MES JUGES :

MONSIEUR LAPP

PROFESSEUR DE CHIMIE ANALYTIQUE
DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG

Témoignage de mon respect et de ma reconnaissance.

MONSIEUR CORDIER

PROFESSEUR DE PHARMACIE CHIMIQUE
DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG

Hommage respectueux de profonde gratitude.

A MONSIEUR J. MEYER

EX-CHEF DE TRAVAUX PRATIQUES
DE BACTÉRIOLOGIE ET DE PARASITOLOGIE
DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG

Expression de profonde gratitude pour l'aide précieuse qu'il n'a cessée de nous témoigner dans l'élaboration de ce travail.

A MONSIEUR RENÉ WEIL

Nos remerciements sincères pour son aide et ses conseils pratiques.

A LA GLORIEUSE MÉMOIRE
DE MON PÈRE

MORT AU CHAMP D'HONNEUR

Je lui dédie ce modeste travail.

A MA MÈRE

En faible gage de mon affection filiale.

A MA SŒUR

A MON FRÈRE

A MON BEAU-FRÈRE

Avec l'expression de ma tendresse fraternelle.

A MON ONCLE D. ZACHARIEV, PHARMACIEN

Dont la vie toute de travail et de dévouement a toujours été pour moi le meilleur des exemples et des encouragements.

En témoignage de ma vive affection et profonde reconnaissance.

A MES GRANDS-PARENTS

In memoriam

A TOUTE MA FAMILLE

A MES AMIS

INTRODUCTION

Le problème de la caractérisation du genre Colibacille, du groupe Salmonella et du Bacille typhique est un des plus importants de la microbiologie en général et de l'hygiène en ce qui concerne l'analyse des eaux en particulier.

Le Colibacille est sûrement une des bactéries les plus étudiées et malgré cela un des moins connus.

En médecine cette bactérie a été considérée très longtemps comme saprophyte ; mais dans les Colibacilloses et de nombreuses autres affections on s'est bientôt rendu compte de la pathogénéité de ce germe, sans pouvoir s'expliquer en quoi et comment cette bactérie de saprophyte devient pathogène.

En hygiène le Colibacille joue un rôle de plus grande importance comme test d'impureté et de contamination des eaux et d'autres substances alimentaires, sans que la présence de cette bactérie soit particulièrement dangereuse. Si on la considère donc comme témoin d'une infection putride, ce n'est qu'une opinion conjecturale et à défaut d'autres moyens rapides d'investigations analytiques.

En bactériologie on considère le Colibacille comme une espèce nettement définie, malgré la variation très grande des propriétés différentielles des nombreuses variétés de Colibacille décrites. Ce problème a été déjà

soulevé en 1889 par Roux et Rodet, sans être résolu jusqu'à nos jours..

En biologie le Colibacille est considéré comme bactérie intestinale typique et intervenant dans la digestion alimentaire de tous les animaux, malgré cela nous savons que l'on rencontre cet organisme abondamment répandu dans la nature.

On se rend compte que le problème du Colibacille devient de plus en plus complexe et est loin d'être résolu à l'heure actuelle.

Si on considère ensuite la position de cette bactérie dans la classification générale de la microbiologie, on sait que l'on a toujours tendance à parler du groupe Coli-Typhique. A ce point de vue la question devient encore plus difficile à résoudre, car nous savons que morphologiquement la différenciation entre le Colibacille, le Bacille typhique et les Salmonella est quasi impossible. En considérant le sujet au point de vue « Analyse culturale », on se rend compte que tous les milieux spécifiques à de rares exceptions près ont été élaborés suivant les principes basés sur les propriétés biochimiques et biologiques du Colibacille. La propriété de cette bactérie de fermenter la plupart des sucres avec production de gaz, particularité faisant souvent défaut aux bacilles typhiques et aux paratyphiques, constitue le principe essentiel de toutes ces techniques.

Il nous a donc semblé intéressant d'essayer pour mettre au point une méthode analytique nouvelle permettant de différencier les bactéries du Groupe Coli-Typhique par un procédé cultural rapide et mettant en évidence non seulement une réaction caractéristique du Colibacille mais surtout spécifique pour les bacilles typhiques et paratyphiques.

Ainsi, si on considère le milieu d'Endo ou le milieu

de Drigalski-Conradi, on obtient une différenciation par modification de la teinte des colonies du Colibacille, tandis que celles des bacilles typhiques et paratyphiques prennent une coloration analogue à presque tous les germes bactériens saprophytes ou pathogènes universellement répandus dans la nature. On se rend donc compte qu'en médecine pathologique par exemple ou en biologie on a tout intérêt de pouvoir caractériser spécifiquement les Typhiques et les Paratyphiques et non pas les Colibacilles qui sont présents normalement dans toutes les matières fécales et même alimentaires.

C'est pour cette raison, que nous avons sur les conseils de M. le Professeur A. Sartory, Doyen de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg et sous la direction de M. Jacques Meyer, Ex-Chef des Travaux de Bactériologie et de Parasitologie de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, entrepris ce travail en employant une méthode culturale qui nous a semblé n'avoir pas suffisamment retenue l'attention des microbiologistes et qui nous a parue intéressante d'étudier de plus près, *c'est la réaction dite « au Plomb »*.

Notre travail est divisé en trois parties : la première partie est destinée à l'historique de la question, la deuxième a trait à l'exposé de nos travaux personnels et finalement dans la dernière partie nous donnons les conclusions générales résultant de nos recherches.

Le Chapitre Premier est destiné à l'exposé des propriétés générales du Colibacille, du Bacille typhique et des Salmonella. A ce sujet nous avons utilisé les exposés qui se trouvent généralement dans les traités de microbiologie.

Dans le Chapitre Deuxième nous relatons les différentes méthodes et techniques culturales employées

habituellement pour caractériser le Groupe Coli-Typhique.

L'exposé de nos travaux personnels est divisé de la façon suivante : Dans le Chapitre Troisième nous donnons la méthode de préparation des milieux « au Plomb » que nous avons utilisés.

Le Chapitre Quatrième est destiné à l'étude des dosages des différentes formes de Soufre pouvant exister dans les milieux culturaux.

Nous avons ensuite envisagé dans le Chapitre Cinquième l'exposé de nos différentes expériences au moyen des milieux « au plomb » contenant soit du Soufre minéral, soit du Soufre organique, et effectué avec plusieurs souches de Colibacilles, de Bacilles typhiques, de Bacilles paratyphiques A et de Bacilles paratyphiques B.

Le Chapitre Sixième envisage la question biologique qui s'est posé à la suite de nos recherches et qui a trait aux réactions d'oxydo-réduction, question d'actualité de très grande importance, et à l'interprétation des réactions biochimiques dues au métabolisme des différentes bactéries.

Nous résumons dans les Conclusions Générales les faits qui se sont dégagés de nos expériences et nous essayons d'expliquer ces réactions par des considérations chimiques et biologiques.

Avant de terminer l'exposé de ce plan général de notre travail, nous tenons à exprimer ici nos remerciements bien respectueux à M. le Professeur A. Sartory, Doyen de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg qui n'a cessé de nous témoigner son intérêt et sa sollicitude pendant tout le temps de l'élaboration de ce travail et pendant tout notre séjour à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg.

Notre gratitude va également à MM. les Professeurs Ch. Lapp et P. Cordier qui ont bien voulu accepter de participer au Jury de notre Thèse et qui d'autre part nous ont permis de profiter de leur grande expérience en suivant leur enseignement particulier sur les problèmes de la Chimie Alimentaire et de la Chimie Biologique.

A M. Jacques Meyer, Ex-Chef des Travaux Pratiques de Bactériologie et de Parasitologie de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg nous savons tout particulièrement gré d'avoir bien voulu nous inspirer notre sujet et d'avoir voulu nous diriger au cours de son élaboration.

A M. René Weil, aide-laboratoire, qui nous a aidé dans l'exécution pratique de nos expériences, nous adressons l'assurance de notre souvenir bien reconnaissant.

CHAPITRE PREMIER

GÉNÉRALITÉS SUR LES BACTÉRIES DU GROUPE COLI-TYPHIQUE

1) Le Colibacille.

Le Colibacille a été découvert en 1885 par Escherich dans les selles de nourrissons et d'enfants nourris au lait. Depuis il a été signalé comme une espèce constante de l'intestin de l'homme et des animaux, d'où ses diverses dénominations : Colibacille, Bacterium coli, bacillus coli communis, bacille d'Escherich.

D'abord considéré comme un simple saprophyte sans aucune importance, on a constaté par la suite qu'il pouvait produire des inflammations de l'intestin (entérites, choléra infantile), du péritoine (péritonites par perforation ou à la suite d'étranglement herniaire), des voies biliaires (angiocholites), des voies urinaires (pyélites et cystites), de la matrice et des annexes (infections puerpérales, etc...), du tissu cellulaire sous-cutané pour donner des phlegmons gazeux. Quelques-uns ont désigné le germe causal de cette dernière affection, qui n'est cependant rien d'autre que le Colibacille, le Bacillus pyogenes fœtidus. Le Colibacille peut provoquer parfois des septicémies.

Il joue aussi un certain rôle pathogène chez l'animal.

On signale son intervention dans la polyarthrite des poulains, dans la diarrhée des veaux, etc...

Enfin, après la mort et quelquefois au cours de l'agonie, le Bacterium coli émigre de l'intestin dans la profondeur des organes. Il s'en suit que la constatation de ce bacille sur le cadavre est bien souvent dépourvue de toute signification pathogénique.

Provenant des excreta, le Colibacille peut être disséminé dans tous les milieux extérieurs. On le rencontre fréquemment dans l'eau, presque constamment dans le lait et toujours dans les couches superficielles du sol.

Morphologie. — Les éléments sont de courts bâtonnets à extrémités arrondies, mesurant 2 à 3 μ de longueur sur 0,5 à 0,8 μ de largeur. Ils sont isolés ou réunis deux par deux ou en petits amas. Ils présentent quelquefois la forme en navette avec une vacuole centrale peu ou pas colorée. Ils sont habituellement mobiles ; on peut toutefois rencontrer quelquefois des échantillons complètement immobiles.

Ils se colorent facilement avec les diverses matières colorantes, sont Gram négatifs et dépourvus de spores.

Cultures. — Le Colibacille se cultive sur tous les milieux et fournit habituellement un développement abondant. Il est un anaérobie facultatif.

Il pousse déjà à la température ordinaire comme il peut encore se développer à des températures relativement élevées (+ 42 à + 45°). Sa température optimale est aux environs de + 37°.

C'est un microbe fort résistant et il conserve durant des mois sa vitalité dans les cultures comme dans les milieux extérieurs.

Gélose. — Il y développe un enduit blanc crémeux peu caractéristique. Bien souvent le fond du tube présente de petites bulles de gaz, provenant de la fermentation des traces de glucose contenues dans toute viande.

Gélatine. — Il n'y a pas de liquéfaction.

En piqûre il se forme dans le canal une petite traînée de colonies et à la surface un enduit blanc crémeux à contour irrégulier pouvant atteindre les bords du tube.

Sur plaques les colonies superficielles sont lenticulaires, bleuâtres d'abord, blanches et opaques dans la suite. Elles peuvent atteindre 1/2 centimètre et plus de diamètre.

Pomme de terre. — Il s'y forme un enduit très apparent, gras, visqueux et luisant.

Bouillon. — Au bout de peu d'heures, trouble uniforme donnant par agitation des ondes moirées. Il se forme souvent après quelques jours à la surface du liquide une pellicule grisâtre. Ces cultures dégagent une odeur fécaloïde caractéristique et elles produisent abondamment de l'indol.

Lait. — D'ordinaire coagulation rapide.

Le Colibacille fait fermenter avec production de gaz la plupart des sucres : le glucose, le lactose, le maltose, la mannite, etc... Beaucoup d'échantillons fermentent aussi le saccharose.

La plupart des milieux spéciaux utilisés pour différencier le Colibacille du Bacille typhique sont basés sur les propriétés fermentatives du Colibacille et sur l'absence de celles-ci chez le bacille d'Eberth. Nous décrirons ces essais à propos du Bacille typhique.

Le Colibacille réduit énergiquement le Neutralrot (rouge neutre) et les milieux additionnés de ce colorant présentent après 24 heures d'étuve une fluorescence marquée.

Il produit habituellement de l'hydrogène sulfuré et de ce fait la plupart des souches noircissent la gélose à l'acétate de plomb.

On désigne habituellement du nom de « *Paracoli* » les bacilles d'Escherich dont les caractères s'écartent assez notablement de la description que nous venons de donner.

On distingue divers types de *Paracoli* :

a) le type immobile ;

b) le type ne produisant pas d'indol ;

c) le type ne coagulant pas le lait ;

d) le type chromogène, à pigment vert, trouvé habituellement dans les selles des enfants atteints de diarrhée verte.

Le pigment apparaît dans les cultures, surtout dans celles développées sur gélose.

Certains types peuvent combiner deux ou trois anomalies et ainsi se différencier des types signalés.

Quelques auteurs ont proposé une classification des Colibacilles basée sur les propriétés fermentatives. Celle-ci n'est plus prise en considération, depuis qu'il est établi que les propriétés fermentatives ne sont pas immuables. Elles peuvent entre autres changer sous l'action des bactériophages.

Virulence. — Elle est assez variable.

L'animal le plus réceptif est le cobaye. Suivant leur virulence, l'inoculation sous-cutanée des cultures produit un abcès ou une septicémie mortelle.

Le lapin et la souris sont un peu moins réceptifs,

tout en étant toutefois assez sensibles, pour mourir quelquefois de septicémie à la suite de l'inoculation de culture.

Procédés de diagnotsic. — La recherche du Colibacille doit se faire par culture. Quand il s'agit de l'isoler d'un produit où il existe en association avec d'autres germes de toutes espèces (par exemple dans les selles), on peut à la rigueur utiliser les milieux employés pour la recherche du Bacille typhique. Les colonies du Colibacille s'y reconnaissent en quelque sorte d'emblée par la coloration rouge qu'elles produisent. (Voir plus loin.)

Nous allons indiquer dans la partie générale, la technique à suivre pour isoler le Colibacille de l'eau potable.

L'identification des germes ainsi isolés doit se faire par l'étude des caractères morphologiques et des particularités des cultures.

L'essai de l'agglutination si souvent utilisée pour l'identification des autres germes, ne peut être ici d'aucune utilité. En effet, vu le particularisme étroit des différents échantillons, le sérum d'un animal vacciné n'exerce son action agglutinante que sur l'échantillon qui a servi à préparer l'animal et est habituellement sans influence sur les Colibacilles d'une autre provenance.

Immunité. — A part quelques essais isolés de vaccinothérapie, nous n'avons pas connaissance qu'on ait appliqué la vaccination ou la sérothérapie en médecine humaine.

Les vétérinaires traitent certaines diarrhées des veaux et certaines polyarthrites des poulains par un sérum anticolibacillaire polyvalent. Étant donné la multiplicité des souches de Colibacilles, nous croyons que malgré

tout, le sérum est encore souvent totalement dépourvu d'activité spécifique pour les souches infectantes en cause.

2) **Le Bacille typhique.**

Le Bacille typhique a été découvert en 1880 par Eberth dans les organes de typhiques. Gaffky a obtenu le premier des cultures.

Le Bacille d'Eberth se rencontre chez les dothiénentériques dans les organes, dans le contenu de l'intestin et dans le sang. En effet, la fièvre typhoïde est une véritable septicémie avec localisations électives dans certains organes, notamment dans la rate, les voies biliaires, les ganglions mésentériques, etc...

On le rencontre aussi dans les complications qu' peuvent survenir au cours ou après la fièvre typhoïde. C'est ainsi qu'on peut le trouver dans les ostéites, les pleurésies, les abcès, etc...

Le microbe est éliminé de l'organisme par les selles et quelquefois par les urines.

Les bacilles peuvent persister dans les excreta des typhiques après leur guérison. Leur persistance dans le contenu de l'intestin est généralement due à une infection spécifique des voies biliaires. Les personnes, qui éliminent ainsi le Bacille d'Eberth, sont dites porteuses de germes. On rencontre quelquefois des porteurs de germes chez les sujets qui n'ont pas été malades ou qui n'ont présenté que des troubles bénins qui ont passé inaperçus.

Les Bacilles typhiques éliminés avec les excreta peuvent contaminer les milieux extérieurs et divers auteurs les ont trouvés dans la terre, dans l'eau de

boisson, dans le lait et d'autres aliments contaminés.

Morphologie. — Le Bacille typhique se présente dans l'organisme sous forme de bâtonnets longs de 2 à 3 μ et larges de 0,5 à 0,8 μ. Dans les cultures ses dimensions sont assez variables, et à côté d'éléments courts on peut y rencontrer des formes longues et filamenteuses. Sur les milieux solides, la forme trapue prédomine.

Les bâtonnets sont isolés ou réunis en courtes chaînettes de 2 à 4 éléments. Ils sont fort mobiles et dans les cultures fraîches en bouillon on peut en voir qui traversent le champ microscopique avec une très grande rapidité. Ils sont Gram négatifs et se colorent facilement avec les diverses matières colorantes, qu'ils fixent habituellement d'une manière uniforme. Quelquefois, ils présentent à leur centre un espace clair qu'au début on avait considéré à tort comme une spore (forme en navette). Le Bacille typhique ne sporule pas.

Cultures. — Il pousse en absence comme en présence d'air sur tous les milieux de culture habituellement utilisés. Il y conserve longtemps sa vitalité et les repiquages sont habituellement bien fertiles avec des cultures âgées de plusieurs mois. Sa température optimale pour le développement est 35° à 37°, mais celui-ci se produit jusqu'à 46°.

Gélose. — Une traînée blanchâtre crémeuse n'offrant rien de typique.

Gélatine. — En piqûre, développement analogue à celui du Colibacille. Sur plaques, les colonies superficielles forment habituellement des petits disques de

3 à 4 millimètres de diamètre, transparents et bleutés à la périphérie, plus épais et opaques au centre. Les bords de ces colonies sont irrégulièrement échancrés et leur surface tourmentée rappelle assez bien une montagne de glace. D'autres auteurs ont comparé l'aspect de ces colonies (une partie centrale surélevée d'où partent radiairement des sillons) à une feuille de vigne.

Le Bacille d'Eberth ne liquéfie pas la gélatine.

Pomme de terre. — Le développement s'y fait sans que la culture y devienne apparente.

Bouillon. — Trouble uniforme présentant lors de l'agitation des ondes moirées, visibles surtout par transparence. Après quelques jours apparaissent dans le milieu des flocons blanchâtres, qui se déposent au fond du tube. Il ne se forme pas de voile à la surface, sauf dans certains cas, quand les cultures sont journellement repiquées en bouillon.

La culture ne dégage aucune odeur bien spéciale. Pas de production d'indol.

Eau peptonisée. — Mêmes caractères que dans le milieu précédent.

Lait. — Développement abondant sans coagulation.

En raison de sa ressemblance avec certains autres germes, notamment avec le Colibacille et les Bacilles paratyphiques, on doit utiliser pour le différencier de ceux-ci des milieux spéciaux.

Le Bacille typhique se distingue du Colibacille, outre les différences déjà mentionnées à propos des caractères sur les milieux usuels :

1° Par l'absence de production de gaz dans le bouillon

ou la gélose glucosée. Sur ces milieux, le Colibacille produit abondamment des gaz. On met cette production en évidence en ayant recours à l'une ou l'autre des techniques connues en général en Bactériologie.

2° Le Bacille d'Eberth se développe dans le sérum de lait tournesolé sans y produire de trouble et sans modifier la teinte du milieu. Le Coli y produit un trouble très accusé et le fait virer au rouge.

Ci-dessous la technique à suivre pour préparer ce milieu désigné dans les traités allemands sous le nom de Lackmusmolke de Petruschky.

a) chauffer du lait frais à 40° ou 50° et le diluer de moitié avec de l'eau ordinaire ;

b) y ajouter la quantité d'acide chlorhydrique dilué nécessaire pour y précipiter toute la caséine. Filtrer ;

c) neutraliser le filtrat avec une solution de soude et stériliser durant une heure dans la vapeur d'eau à 100° (bien s'assurer que la réaction est légèrement alcaline avant de chauffer le filtrat, sinon l'albumine du sérum de lait se coagule) ;

d) filtrer jusqu'à obtenir un liquide parfaitement clair et alors y ajouter la quantité de teinture de tournesol nécessaire pour teinter le liquide légèrement en bleu ;

e) répartir le liquide ainsi préparé en tubes, les boucher et stériliser.

3° Le Bacille typhique rougit et coagule le milieu de Barsiekow glucosé. Le Colibacille rougit et coagule les milieux lactosé et glucosé.

Ci-dessous la composition du milieu de Barsiekow :

A) *Le milieu glucosé*			B) *Le milieu lactosé*		
Glucose	1	gr.	Lactose	1	gr.
Nutrose	1	»	Nutrose	1	»
Sel de cuisine	0,5	»	Sel de cuisine	0,5	»
Teint. de tournesol .	7	cc.	Teint. de tournesol .	5	cc.
Eau	100	»	Eau	100	»

Le Bacille typhique attaque sans dégagement de gaz, le glucose, le maltose et le galactose. Il est sans action sur le lactose et le saccharose.

4° Le Bacille typhique ensemencé soit en piqûre soit en mélange dans la gélose fondue se développe dans la gélose au rouge neutre, sans y produire de modification appréciable, alors que le Colibacille fait disparaître la coloration rouge pour la remplacer par une teinte fluorescente verte.

On prépare ce milieu en ajoutant à 100 cc. de gélose nutritive glucosée liquéfiée (contenant pour 100 cc. de 0,5 à 0,75 de gélose et 0,5 de glucose) 1 cc. d'une solution aqueuse saturée de Neutralrot (solution stérilisée).

5° Enfin le procédé le plus sûr et le plus expéditif pour l'identification du Bacille d'Eberth est sans aucun doute l'essai de l'agglutination.

Le sérum d'animaux vaccinés agglutine spécifiquement les Bacilles typhiques, quelle que soit leur provenance. On peut à la rigueur isoler quelquefois des souches peu agglutinables, mais elles le sont toutefois toujours par des doses un peu élevées du sérum agglutinant et elles deviennent généralement normalement agglutinables après quelques repiquages. Étant donné que le Bacille d'Eberth ne présente aucune tendance à individualiser ses souches, l'essai de l'agglutination constitue le procédé de choix et sans conteste la méthode la plus employée pour son identification. On peut à la rigueur aussi utiliser avec le même succès les autres anticorps spécifiques contenus dans le sérum antityphique.

Virulence. — Le pouvoir pathogène pour les animaux peut être mis en évidence par l'injection de cultures, mais c'est seulement par l'ingestion de celles-ci

qu'on a pu réaliser une maladie analogue à la fièvre typhoïde chez l'homme. Le chimpanzé est le seul animal chez lequel cette reproduction expérimentale a pu se faire.

Quant aux inoculations, elles provoquent chez les animaux de laboratoire, suivant la virulence de la souche et la dose inoculée, une lésion locale ou une septicémie mortelle.

Procédés de diagnostic. — Les recherches utilisées pour établir le diagnostic bactériologique sont multiples et nous décrivons susccesivement :

1° l'hémoculture ;

2° la recherche du Bacille typhique dans les excreta avec comme annexe la recherche du Bacille d'Eberth dans l'eau ;

3° la réaction de Widal.

L'Hémoculture. — On prélève aseptiquement par ponction d'une veine du pli du coude 4 à 5 cc. de sang que l'on ensemence immédiatement dans 200 à 300 cc. de bouillon. Au lieu d'introduire cette quantité de sang dans un ballon de bouillon, on peut aussi opérer l'ensemencement en répartissant le sang par petites quantités (quelques gouttes) dans une série de tubes de bouillon.

Quelle que soit la technique suivie, il est toujours nécessaire de faire un ensemencement massif (les Bacilles typhiques n'existant pas avec une telle abondance dans le sang qu'une goutte suffit toujours pour donner un ensemencement fertile) dans une grande quantité de milieu de culture liquide, afin de diluer de la sorte le sang d'une manière suffisante pour que le développement des Bacilles typhiques ne puisse être influencé

ni par la coagulation du sang, ni par l'action bactéricide du sérum du malade. C'est pour ne pas s'être conformé à cette double règle qu'avant Castellani, on n'avait pas obtenu des ensemencements fertiles avec le sang des typhiques et qu'on avait considéré cette maladie comme une affection locale de l'intestin avec envahissement de son système lymphatique : ganglions mésentériques, rate, etc...

L'hémoculture pratiquée telle que nous venons de l'indiquer est la méthode de choix pour établir le diagnostic bactériologique de la dothiénentérie. Elle fournit 100 % de résultats positifs chez les malades encore dans la première semaine de leur affection.

Malheureusement, ces hémocultures sont difficilement réalisables dans la pratique.

Afin de simplifier les opérations, Conradi et d'autres ont conseillé d'ensemencer le sang du malade (2 cc. environ) dans de la bile de bœuf stérilisée.

Cette dernière substance constitue un excellent milieu de culture pour le Bacille typhique et tout en rendant le sang incoagulable, elle empêche son action bactéricide.

En Allemagne, avant la guerre de 1914-1918, on avait mis des tubes de bile dans le commerce et il suffisait d'y introduire le sang prélevé aseptiquement, et d'expédier le tube ensemencé au laboratoire chargé de l'analyse.

On place alors ce tube durant 12 à 24 heures à l'étuve à + 37° pour y prélever après de quoi ensemencer d'autres milieux, habituellement des boîtes de Petri contenant le milieu d'Endo ou celui de Drigalski.

Si les diverses opérations de l'ensemencement ont été pratiquées d'une façon aseptique, on peut tout aussi bien faire l'ensemencement pour identifier le développe-

ment obtenu, sur de la gélose ou dans du bouillon ; mais étant donné qu'en pratique ces conditions sont rarement réalisées, l'ensemencement sur l'un ou l'autre milieu spécial s'impose.

Pour l'hémoculture on peut utiliser de la bile comme telle (formule de Kayser) ou de la bile additionnée de peptone et de glycérine (formule de Conradi).

Ci-dessous la technique pour préparer la bile d'après les indications de Kayser :

1° Chauffer la bile de bœuf durant 1/4 d'heure dans la vapeur à 100°.

2° La filtrer sur ouate et la répartir en raison de 5 cc. par tube.

3° Boucher les tubes et les stériliser durant une heure dans la vapeur à 100°.

Conradi prépare ce milieu comme suit :

1° Ajouter à de la bile fraîche 10 % de peptone et 10 % de glycérine.

2° Stériliser durant 2 heures dans la vapeur à 100°.

3° Répartir dans les tubes (5 cc. par tube), fermer les tubes et les stériliser de nouveau durant 2 heures à 100°.

Les résultats obtenus avec ces deux préparations s'équivalent et se confondent sensiblement avec ceux obtenus par l'ensemencement direct dans le bouillon.

Au cours de la première semaine de la fièvre typhoïde, des ensemencements fournissent 100 % de résultats positifs. Dans la suite ce pourcentage devient moins important, tout en restant encore fort élevé, et au troisième septenaire de la maladie l'hémoculture fournit encore d'après Kathe environ 50 % de succès.

Les résultats sont moins favorables quand on utilise pour l'hémoculture le caillot de l'échantillon de sang envoyé pour la réaction de Widal. Néanmoins d'après

Gaethgens, ils sont encore positifs dans un tel pourcentage des cas (46% des cas durant les 2 premières semaines) qu'il est utile de compléter les indications de la réaction de Widal par l'ensemencement de ce caillot sur les milieux appropriés (d'abord dans la bile ou le bouillon, ensuite sur le milieu d'Endo ou de Drigalski).

La recherche du bacille typhique dans les excreta. — A cause de la coexistence dans ces produits d'une masse de microbes saprophytes de toutes espèces, la recherche du Bacille typhique ne peut se faire qu'en utilisant des milieux spéciaux contenant certaines substances à doses te les qu'elles soient antiseptiques pour la plupart des microbes saprophytes (krystall-violet, fuchsine basique) ainsi que des produits fermentescibles permettant d'y différencier les Colibacilles des Bacilles typhiques.

Les milieux d'Endo et Drigalski sont sans conteste les plus employés.

Pour les préparer on utilise une gélose ordinaire, dont ci-dessous la composition :

2000 cc. d'eau
80 gr. d'agar
20 » d'extrait Liebig
20 » de peptone Witte
10 » de sel de cuisine.

Chauffer durant 2 heures à 110° ou durant 1 heure à 120°. Filtrer à travers de l'ouate, répartir le filtrat en ballons et le stériliser durant 50 minutes dans la vapeur à 100°.

Milieu d'Endo. — Pour obtenir ce milieu, on

liquéfie 2 litres de cette gélose ordinaire et on y ajoute :

20 gr. de lactose
20 cc. d'une solution de soude à 10 %
10 cc. d'une solution saturée alcoolique de fuchsine basique
5 gr. sulfite de soude, dissous dans 50 cc. d'eau bouillante.

On répartit le milieu en boîtes de Petri stérilisées ou en tubes à raison de 15 à 20 cc. par tube. Dans ce dernier cas, il y a lieu de stériliser le milieu durant 20 minutes à 115° pour en assurer la conservation.

Remarques. — I. On prépare la solution alcoolique de fuchsine en faisant macérer durant 18 à 20 heures 10 grammes de fuchsine basique cristallisée dans 100 cc. d'alcool à 96°. Filtrer ensuite la solution.

II. Il faut ajouter le sulfite de soude à l'eau bouillante et ne pas le faire bouillir avec celle-ci.

Milieu de Drigalski-Conradi. — Ci-dessous la formule de ce milieu :

1) Préparer 2 litres de gélose ordinaire contenant, outre les substances indiquées dans la formule donnée ci-dessus, 20 grammes de nutrose.

2) Liquéfier ce milieu et y ajouter :

a) 300 cc. de teinture de tournesol, 30 grammes de lactose ;

b) de la soude caustique à 10 % jusqu'à ce que l'écume produite par agitation du milieu se colore légèrement en bleu ;

c) 20 cc. d'une solution aqueuse de krystall-violet à 0,1 gr. pour cent fraîchement préparée.

Remarque. — Il faut stériliser dans la vapeur à 100° durant un quart d'heure :

I. Le mélange de 300 cc. de teinture de tournesol et de 30 grammes de lactose.

II. La soude à 10 % et

III. La solution fraîchement préparée de krystall-violet.

Le milieu ainsi préparé est réparti dans de grandes boîtes de Petri stérilisées ou conservé jusqu'à son emploi dans des ballons. On liquéfie au moment du besoin le milieu au bain-marie et on l'introduit dans des boîtes de Petri.

Pour pratiquer la recherche du Bacille d'Eberth dans l'urine ou les selles, on étale le produit à analyser sur la surface de l'un ou l'autre de ces milieux au moyen d'une tige en verre courbée, appelée spatule de Drigalski.

Afin d'avoir des colonies bien isolées, on passe avec la spatule qui a servi à ensemencer la première boîte, sur une seconde et éventuellement sur une troisième, sans la recharger de produit. Dans ces conditions, on obtient toujours au bout de 24 heures d'étuve des colonies bien isolées.

Le Colibacille donne sur ces deux milieux des colonies rouges et opaques, le Bacille typhique et les Bacilles paratyphiques des colonies incolores sur le milieu d'Endo, transparentes et bleues sur le milieu de Drigalski.

Identification de ces colonies. — Elle se fait d'après la technique suivante :

On commence par vérifier la nature des colonies suspectes comme typhiques par l'essai de l'agglutination microscopique.

Ci-dessous la méthode opératoire pour cette recherche :

1° mettre sur une lame deux gouttes distinctes, l'une d'eau physiologique, l'autre d'une dilution de sérum antityphique très actif par exemple à la dilution de 1 % ;

2° étaler avec l'öse dans la goutte d'eau physiologique un peu de culture prélevée au niveau d'une colonie suspecte. Cet étalement doit se faire de façon à obtenir une émulsion faible et homogène dans la goutte en question. Faire la même opération dans la goutte de sérum dilué. Prendre soin de ne pas passer l'öse d'une goutte dans l'autre, car dans ce cas on risque de mélanger du sérum agglutinant à l'eau physiologique ;

3° recouvrir les deux gouttes d'un couvre-objet et observer le résultat de l'essai au microscope.

Dans la goutte d'eau physiologique, les Bacilles forment une émulsion bien homogène et y conservent toute leur mobilité ; au contraire, dans la goutte de sérum dilué, si la colonie en question est en réalité une colonie typhique, on voit ces bacilles devenir immobiles, s'accoler les uns aux autres, pour former finalement des masses plus ou moins compactes.

On continue l'identification des colonies, qui ont fourni une agglutination microscopique positive, en en prélevant de quoi ensemencer un tube de gélose inclinée, dont la culture sera utilisée pour l'essai de l'agglutination macroscopique et pour l'ensemencement des milieux suivants : pomme de terre, lait, petit lait tournesolé et bouillon.

On considère comme Bacilles typhiques les colonies qui fournissent un développement typique sur les milieux précités et dont la culture est spécifiquement agglutinée par le sérum antityphihque. L'agglutination obtenue avec une dose correspondant au double du titre du sérum est envisagée comme spécifique. Nous

faisons remarquer à ce sujet que les cultures fraîchement isolées, surtout celles provenant de la culture sur les milieux au vert de malachite, peuvent présenter, dans leurs premières générations, une certaine inagglutinabilité, d'où il résulte qu'il y a lieu quelquefois de reprendre cet essai après quelques repiquages.

D'après Lôffler, l'addition aux milieux de culture d'une certaine quantité de vert de malachite empêche le développement des Colibacilles, sans gêner la multiplication du Bacille d'Eberth.

En Allemagne on a préconisé ces milieux au vert de malachite pour assurer un développement électif des Bacilles typhiques au détriment des Colibacilles et faciliter leur recherche dans les excreta, où ils peuvent être peu nombreux.

Sur ce milieu, les colonies du Bacille d'Eberth ne présentent rien de caractéristique et pour dépister les Bacilles typhiques il faut réensemencer le produit de cette première culture sur le milieu d'Endo ou de Drigalski.

Le milieu au vert de malachite n'est pas aussi électif que Löffler ne le prétend et il ne se conserve pas. D'où il en résulte qu'il n'est guère employé.

Ci-dessous sa préparation :

I. Déterminer la réaction de la gélose ordinaire en prenant comme réactif la phénolphtaléïne.

S'il faut par exemple pour 100 cc. de la gélose liquéfiée 2,5 cc. d'une solution normale de soude, on ajoute à 100 cc. de cette gélose additionnée au préalable de 0,5 cc. d'une solution alcoolique à 0,5 gr. % de vert de malachite, cette quantité de soude normale moins un cc. soit 1,5 c . S'il fallait 3,5 cc. de la solution de soude, on ajoutera 2,5 cc. à la gélose additionnée de la solution alcoolique de vert de malachite.

II. Répartir le milieu en boîtes de Petri que l'on utilise immédiatement ou que l'on conserve à la glacière (3 à 5 jours) jusqu'au moment du besoin.

Comme on peut le constater, les recherches à exécuter pour mettre le Bacille typhique en évidence dans les excreta sont longues et laborieuses. Aussi peut-on dire que pratiquement elles ne se font guère dans un but de diagnostic : on a à cet effet des méthodes plus sûres et plus simples.

On comprend donc l'importance de notre travail, ayant justement pour but d'élaborer une technique permettant le dépistage du Bacille typhique et des Paratyphiques d'une façon plus simple et plus facile, surtout pour le diagnostic des porteurs de germes.

Recherche du Bacille typhique dans l'eau. — Pour rechercher les Bacilles d'Eberth dans l'eau, il est presque toujours nécessaire de les concentrer par un artifice quelconque. La méthode de Chantemesse légèrement modifiée nous paraît la plus recommandable.

On ajoute à 100 cc. de l'eau à analyser la quantité de sel de cuisine voulue pour obtenir une teneur en sel de 6 à 8 °/oo et un centimètre cube d'une forte agglutinine antityphique. Le mélange placé d'abord durant 2 heures à l'étuve est ensuite centrifugé : le sédiment est étalé avec la spatule de Drigalski sur le milieu d'Endo ou de Drigalski.

La réaction de Widal. — Dans l'organisme des personnes atteintes de fièvre typhoïde, il se forme des agglutinines spécifiques, dont la recherche peut être utilisée pour établir le diagnostic.

A cet effet, on prélève une petite quantité de sang

du malade que l'on laisse coaguler pour recueillir le sérum ou que l'on centrifuge avec une quantité connue d'eau physiologique.

On dilue le sérum ou le liquide clarifié par centrifugation de façon à obtenir une dilution du sérum du malade au dixième.

On répartit cette dilution de sérum comme il est indiqué ci-dessous et on y ajoute les quantités d'eau physiologique et d'émulsions typhiques et paratyphiques marquées dans le tableau.

Numéros des tubes	1	2	3	4	5	6	7
Quantité de sérum dilué au 1/10....	0,4	0,2	0,1	0,05	0	0,1	0
Quantité de culture.	0,5 cc. cult. typhique					0,5 cult. P. T. B.	
Quantité d'eau physiologique	0,1	0,3	0,4	0,45	0,5	0,4	0,5

On peut utiliser pour cet essai une émulsion de Bacilles vivants (pour un tube de culture sur gélose inclinée, 6 à 10 cc. d'eau physiologique suivant l'abondance du développement) ou une émulsion de bacilles typhiques tués par chauffage durant 1 heure à 55° ou par addition d'antiseptique (thymol, par exemple). Les émulsions de bacilles tués présentent comme avantage une conservation aisée et d'être toujours prêtes au moment du besoin. En plus il n'y a pas le danger que présente la manipulation d'une culture vivante.

Le mélange opéré tel qu'il est indiqué dans le tableau est placé durant 2 à 3 heures à l'étuve à 37° et on peut lire alors le résultat.

Le Widal est considéré comme positif, quand l'agglu-

tination est positive à la dilution au 50e. Il y a lieu toutefois, pour apprécier ce résultat, de tenir compte de l'éventualité d'une vaccination antérieure ou d'une affection typhique antérieure guérie, etc...

On pratique l'essai avec une émulsion typhique et paratyphique B, parce que cliniquement les affections produites par ces deux microbes apparentés sont fréquemment confondues.

Manteufel et Beger conseillent de compléter cet essai par la recherche des agglutinines du Bacillus enteritidis (Gärtner) et du Bacillus suipestifer.

Le sérum du malade agglutine l'espèce de microbes, qui a produit l'infection.

Dans quelques cas, l'agglutination influence plusieurs microbes. En l'espèce il s'agit de coagglutinines ou d'agglutinines spécifiques.

Pour éclaircir cette question, on tâchera de priver le sérum de toute agglutinine en y ajoutant une grande quantité de l'émulsion la mieux influencée. Quand cet essai d'absorption permet effectivement d'enlever les agglutinines pour les divers microbes, l'action exercée sur les microbes moins agglutinés était l'œuvre des coagglutinines. Par contre, il s'agit d'agglutinines spécifiques, quand le sérum épuisé avec la culture la mieux agglutinée conserve des agglutinines pour les autres germes. Cette éventualité se présente quand le malade subit une infection associée par les microbes en question.

Les agglutinines n'existent habituellement en quantité suffisante dans le sérum des malades qu'à partir du second septenaire, généralement du 7e au 10e jour de la maladie. Elles y persistent alors durant des semaines, des mois et peuvent être dosées pour le diagnostic rétrospectif.

Il existe toutefois des exceptions dans l'apparition

des agglutinines et il y a des cas où on a trouvé une grande abondance d'agglutinines dès les premiers jours, comme il y a des malades, qui ne fournissent que très tardivement le Widal positif, au cours de la 3e ou 4e semaine par exemple.

Immunité. — Depuis des années la vaccination antityphique est entrée dans la pratique courante et les statistiques faites au cours de la Grande-Guerre 1914-1918 ont définitivement établi sa valeur.

Plusieurs vaccins ont été proposés. Les émulsions bacillaires sont plus employées que les autolysats.

La plupart se servent de cultures jeunes sur gélose qu'ils émulsionnent dans une solution saline et qu'ils tuent par l'action de la chaleur ou des antiseptiques.

Leishman utilise des cultures en bouillon neutre ayant 24 à 48 heures de séjour à l'étuve, tuées par chauffage à 53° durant une ou deux heures et additionnées, après refroidissement de 0,4 % de lysol.

Comme il existe diverses races de Bacilles typhiques, et que certaines de ces variétés semblent avoir une action beaucoup plus nocive que d'autres, on emploie des vaccins polyvalents préparés avec plusieurs races de Bacilles typhiques en y joignant les Bacilles paratyphiques.

Un vaccin antityphique à recommander est constitué d'un mélange de trois parties de cultures typhiques et d'un quart contenant des quantités égales de Bacilles paratyphiques A et B. Ces émulsions sont additionnées de 0,5 % de phénol et chauffées à 55° durant une heure.

On en détermine la teneur en microbes d'après la technique de Wright ou celle établie par A. Sartory, J. Meyer et Schmutz. On ajoute la quantité d'eau physiologique phénolée à 0,5 % pour avoir des émulsions

contenant approximativement 1.000.000.000 de germes par centimètre cube.

La technique de la vaccination est la même pour les divers produits. L'inoculation sous-cutanée est faite généralement dans la région deltoïdienne à 8 jours d'intervalle. On pratique habituellement 3 injections comportant respectivement 1/2, 1 et 1 1/2 cc., ce qui représente approximativement 500 millions, 1.000 millions et 1.500 millions de bacilles. Le lipovaccin de Le Moignic, constitué d'une émulsion bacillaire dans de l'huile, est administré en une fois. Du fait que ce dernier se résorbe d'une façon lente et progressive. les manifestations réactionnelles, qui suivent cette inoculation, ne sont pas exagérées et ne dépassent pas en intensité celles observées à la suite de l'injection des autres vaccins antityphiques.

Localement on observe à l'endroit injecté un peu de rougeur et de tuméfaction des téguments, accompagnées d'une douleur plus ou moins accusée. Il n'y a guère de fièvre et la température ne dépasse en moyenne pas 38° à 38°5.

Parfois on observe un léger malaise, une certaine céphalée et la nuit de l'insomnie. Après 24 à 48 heures, toutes ces manifestations se sont amendées et le vacciné n'accuse plus aucun trouble.

Il y a d'ordinaire peu de différence entre le degré de réactions observées à la suite de la première, de la seconde et de la troisième injection. Quelquefois l'une ou l'autre de ces infections est seule suivie de manifestations réactionnelles, alors que les autres inoculations ne donnent lieu qu'à une réaction peu appréciable.

On ne fait pas la vaccination chez les tous jeunes enfants (moins de 4 à 6 ans), chez les personnes atteintes

d'une affection quelconque (influenza, bronchites chroniques, tuberculose, etc...).

Ces injections de vaccins amènent une production d'anticorps spécifiques divers : agglutinines, bactériolysines, bactériotropines, etc...

Il est toutefois admis que l'immunité antityphique résultant soit d'une atteinte antérieure, soit de la vaccination, n'est pas sérique, c'est-à-dire n'est pas le résultat des anticorps élaborés (l'immunité peut exister sans qu'on puisse déceler des anticorps), mais qu'elle est avant tout tissulaire, l'intestin étant devenu infranchissable aux Bacilles typhiques.

Il n'y a rien d'étonnant que l'immunité intestinale s'établisse à la suite d'une atteinte de fièvre typhoïde, étant donné que dans ces cas, l'organe en question a été comme imprégné par l'antigène typhique.

Ces conditions semblent tout différentes chez les vaccinés.

En réalité cette différence n'est qu'apparente.

En effet, ainsi que Besredka l'a établi, les Bacilles typhiques, paratyphiques et dysentriques ont une affinité telle pour l'intestin, que, quelle que soit la voie de leur administration, ils arrivent toujours dans cet organe.

L'entérotropisme de ces microbes se manifeste d'une façon évidente quand on administre la culture par voie sous-cutanée.

Malgré la longueur du trajet qu'on leur impose, malgré l'itinéraire qui sépare la peau de l'intestin, ils arrivent encore à élaborer dans cet organe l'immunité en question.

Celle-ci est évidemment d'autant plus solide que les microbes arrivent en plus grand nombre en contact avec les cellules réceptives. Il est dès lors rationnel de

tenter l'immunisation par les voies digestives, étant donné que dans ces conditions les microbes arrivent directement à destination.

Pour obtenir l'imprégnation voulue, il faut toutefois débarrasser la paroi intestinale de sa couche de mucus par l'administration d'un cholagoque.

Dans ces dernières années, cette méthode de vaccination a été préconisée à diverses reprises et elle est d'une exécution très aisée. Il suffit en effet que les personnes, qui doivent être vaccinées, prennent trois jours de suite, le matin à jeun, une pilule de 10 ou 20 centigrammes de bile et un comprimé contenant un mélange de Bacilles typhiques et de Bacilles paratyphiques A. et B. tués par la chaleur.

Les résultats publiés par Vaillant sont très favorables à cette méthode. Sur une population totale d'environ 2.000 habitants, 1.236 personnes furent vaccinées par l'entéro-vaccin bilié de Besredka ; chez les non-vaccinés il y eut 50 cas de fièvre typhoïde, alors qu'on n'a observé que 7 cas parmi les personnes qui avaient absorbé le vaccin. Sur ces 7 cas, 5 se produisirent le lendemain ou au cours de la vaccination et 2 le dixième jour qui suivit.

Cette méthode mérite d'être essayée sur une grande échelle et si les résultats restent pareils à ceux de la statistique de Vaillant, il n'est sans doute de méthode de vaccination plus assurée de la faveur du public, toujours assez réfractaire à la pratique des inoculations.

Quant à la sérothérapie, elle n'est guère employée.

Chantemesse et d'autres ont montré que l'on peut immuniser des animaux de laboratoire contre l'infection typhique expérimentale, en leur injectant le sérum d'individus guéris de la fièvre typhoïde ou d'animaux vaccinés.

On a dès lors cherché à utiliser ces sérums dans un but thérapeutique et la plupart de ces tentatives ont donné peu de résultats. Ceux obtenus par Chantemesse ont été un peu plus encourageants.

3) Caractéristiques morphologiques des organismes de groupe Salmonella

Les caractéristiques morphologiques de tous les organismes du groupe Salmonella sont les mêmes, de telle sorte que par les méthodes ordinaires d'investigation, il n'est pas possible de différencier les espèces. Une identification positive ne peut être réalisée que par l'emploi de tests sérologiques qui naturellement obligent à utiliser comme sujets des animaux vivants. Or il est bien rare que cette facilité soit donnée aux laboratoires cliniques. En outre, pour procéder avec succès à des recherches de ce genre, il faut posséder une grande expérience de la question et une grande habileté. Si la nécessité survient de procéder à des recherches de ce genre, il sera préférable de faire appel à la collaboration d'un spécialiste. Par contre, il est du domaine du bactériologiste spécialisé de procéder aux essais qui lui permettront de déterminer avec certitude que des organismes du groupe Salmonella sont présents dans un produit qu'il examine, sans en préciser l'espèce. Les renseignements qui suivent facilitent cette étude.

Habitat. — La majorité des membres du groupe existe dans le canal intestinal des animaux vivants. Il faut donc, au moment de l'abatage des bêtes, s'assurer que le contenu de l'intestin ne vienne pas polluer la viande de boucherie.

Sporulation. — Aucun des membres du groupe n'est porteur de spores.

Mobilité. — Il subsiste un certain doute en ce qui concerne la mobilité de certains membres du groupe, mais la majorité est certainement mobile et possède 4 ou 5 flagella. Il est possible que la propriété de se mouvoir dépende de l'âge des cultures.

Ces Organismes se développent facilement dans tous les milieux comme le bouillon nutritif, la gélose et la gélatine. L'incubation doit être effectuée à 37° pour réaliser les conditions optima. En outre, la réaction du milieu, doit être réglé à *p*H : 7,0 (neutralité).

L'aspect des colonies sur plaques de gélose ou de gélatine est le même : pellicule mince, presque transparente, de coloration blanc gris. Aucune liquéfaction de la gélatine ne se produit.

Le bouillon nutritif est rendu uniformément nuageux, mais il n'apparaît pas d'écume, même dans les cultures âgées.

Dans le lait tournesolé, il y a d'abord apparition d'une légère acidité, généralement pendant les 24 premières heures de l'incubation, mais sans qu'il y ait coagulation de la caséine ; l'acidité est bientôt remplacée à la fin d'une période de 48 heures, par une alcalinité permanente. On a vu dans certains cas que ce passage de l'acidité à l'alcalinité ne se produisait qu'au bout de plusieurs jours ou même de plusieurs semaines.

Fermentation : tous les membres du groupe font fermenter le glucose et un petit nombre d'entre eux la dulcite, mais ils sont sans action sur le lactose et le saccharose.

Réaction de l'indol : négative.

Réaction de Voges-Proskoeur : négative.

Tresh, Beale et Suckling ont écrit : « On notera « qu'il ne faut pas attacher une valeur absolue aux réac- « tions de fermentation. » En ce qui concerne la dulcite en particulier, Bruce White a signalé que certaines souches de Bacilles d'Aertrycke et de Bacillus enteriditis et la plupart des souches de Bacillus suipestifer ne font pas fermenter la dulcite, tandis que d'autres comme le Bacillus paratyphosus B. font fermenter ce sucre lentement.

Comportement vis-à-vis de l'oxygène : aérobie facultatif.

En ce qui concerne la température à laquelle ces organismes sont détruits, on ne perdra pas de vue que des travaux récents effectués aux États-Unis et dans d'autres pays ont montré que la température à laquelle il faut élever une culture pour détruire les Organismes et la durée de chauffage dépendent des conditions du milieu et que les indications publiées sur cette question ont besoin d'être contrôlées. La présence de bactéries vivantes, d'espèces ne formant pas de spores dans des boîtes de conserve soumises cependant à des températures élevées, renforce ce point de vue.

LES BACILLES PARATYPHIQUES

En 1896, Achard et Bensaude ont désigné du nom de *Bacille paratyphique* un bacille présentant à la fois certaines propriétés du Colibacille et du Bacille d'Eberth.

Dans la suite, d'autres auteurs ont isolé des germes identiques. Schottmüller a établi le premier qu'il y a lieu de distinguer dans ce groupe de bacilles deux espèces distinctes, que Brion et Kayser ont catalo-

guées sous la dénomination de *Bacille paratyphique A* et *Bacille paratyphique B.*

Ces Bacilles paratyphiques se distinguent du Bacille typhique :

1° Par leur propriété de faire fermenter énergiquement le glucose et le maltose avec production de gaz ;

2° De décolorer le milieu au rouge neutre en y produisant, comme le Colibacille, une fluorescence verte.

Ils se distinguent du Colibacille entre autres :

1° Par l'absence de coagulation du lait et l'absence d'action fermentative sur le lactose ;

2° Par l'absence de production d'indol et de dégagement d'odeur fécaloïde, etc...

Les deux espèces de Bacilles paratyphiques ont comme caractères de différenciation :

1° Le *Bacillus paratyphus A* présente sur pomme de terre un développement à peine visible, tandis que le *Bacillus paratyphus B* y forme un enduit gras visqueux et très évident ;

2° Dans le petit lait tournesolé, le *Bacillus paratyphus A* produit une réaction faiblement acide persistante (coloration rose durable), alors que le *Bacille paratyphique B* acidifie d'abord légèrement le milieu pour l'alcaliniser à nouveau par après (le milieu devenu légèrement rose redevient bleu dans la suite) ;

3° Le *Bacillus paratyphus A* ne produit pas d'hydrogène sulfuré dans les cultures, alors que le *Bacillus paratyphus B* en produit nettement et ressemble sous ce rapport au Bacille d'Eberth. Nous aurons l'occasion de revenir sur cette question.

Pour mettre cette production en évidence, on utilise de la gélose additionnée de sous-acétate de plomb.

Ci-dessous la préparation de ce milieu, généralement recommandé dans les Précis de bactériologie.

Prendre des tubes contenant environ 5 cc. de gélose, faire fondre ce le-ci et ajouter au milieu très chaud 0,1 cc. d'une solution au dixième dans de l'eau distillée de sous-acétate de plomb liquide du Codex, la solution de plomb ayant été stérilisée avant son addition.

L'ensemencement se fait par mélange avant la solidification de la gélose vers la température de 45°, ou par piqûre. Les microbes producteurs d'hydrogène sulfuré donnent une culture noire.

4° Enfin les deux espèces de Bacilles paratyphiques se distinguent entre elles par l'essai de l'agglutination.

Il nous paraît inutile de décrire la morphologie, les caractères de culture, et l'action pathogène de ces microbes pour les animaux de laboratoire. Nous devrions répéter ici les données fournies à propos du Bacille d'Eberth.

Pour établir le diagnostic de ces diverses affections, on utilise comme dans la fièvre typhoïde :

1° La recherche du germe en question par l'hémoculture ou par l'analyse des excreta : les colonies des Bacilles paratyphiques sur les milieux de Drigalski et d'Endo, sont semblables à celles du Bacille d'Eberth avec cette particularité toutefois qu'elles sont peut-être un peu plus opalescentes que les colonies typhiques. Pour leur identification, on opère comme pour le Bacille d'Eberth.

2° L'épreuve de Widal.

Le Bacille paratyphique A est relativement peu répandu et il a été trouvé par quelques auteurs chez un petit nombre de malades atteints d'une affection à évolution clinique analogue à celle de la fièvre typhoïde, mais ordinairement moins grave ; des cas mortels ont été observés.

Par contre, le Bacille paratyphique B a été fréquem-

ment isolé. Il a été constaté chez l'homme où il avait produit tantôt des septicémies analogues à la fièvre typhoïde, tantôt des intoxications alimentaires. Chez les animaux, il intervient fréquemment dans la genèse des affections que Lignières a réunies sous le terme générique de *Salmonelloses*.

Ci-dessous quelques types :

a) Le *Bacille paratyphique B* ou Bacille de Schottmüller, agent des fièvres paratyphoïdes.

b) Le *Bacille d'Aertrycke*, encore connu sous le nom de *Bacillus enteritidis Breslau*, causant chez l'homme des entérites aiguës ou des intoxications alimentaires.

c) Le *Bacillus enteritidis* Gärtner, produisant chez l'homme les intoxications carnées.

d) Le *Bacille de* Morgan, agent des diarrhées estivales et choléri formes et dont il faut rapprocher le *Bacille* de Castellani doué des mêmes propriétés pathogènes.

Ce Bacille, intermédiaire entre les Bacilles paratyphiques et le Colibacille, est mobile.

Il fermente avec production de gaz le glucose, le levulose, le galactose et le maltose. Il est sans action sur le lactose, le saccharose et le mannite.

Il ne coagule pas le lait ; produit abondamment de l'indol et ne noircit pas les milieux à l'acétate de plomb.

Le *Bacille* de Castellani se distingue du *Bacille* de Morgan par son action fermentative sur le saccharose.

e) Le *Bacille du Hog-choléra* encore appelé *Bacillus suipestifer*, décrit par Salmon (1886) comme l'agent pathogène du choléra des porcs, n'est en réalité qu'un surinfectant de cette affection, celle-ci étant produite en réalité par un *virus* mis en évidence par Dorset.

On a décrit toutefois des épizooties porcines produits par des souches de Bacilles paratyphiques distinctes

du Bacillus suipestifer (Glasser, Dammann et Stedefeder, Bruynoghe, etc...).

f) Le *Bacille de la psittacose*, découvert en 1892 par Nocard chez les perroquets atteints d'une maladie infectieuse mortelle.

Ce bacille est également pathogène pour l'homme (Gilbert et Fournier).

g) Le *Bacille du typhus des souris* décrit par Löffler en 1890, pathogène pour les rongeurs et recommandé par divers auteurs pour la destruction des rats et des souris.

Nous mentionnons ici également le Bacille de Danysz, du *ratin*, etc...

h) Le *Bacillus morbificans bovis*, découvert en 1894 par Basenau chez des vaches atteintes de fièvre vitulaire.

i) Le Bacille de certaines diarrhées et de certaines septicémies des veaux (Thomassen, 1897).

j) Le Bacille de certaines épizooties parmi les poules et les dindes (Klein, 1889).

k) Le Bacille de l'avortement épizootique des équidés (Bruynoghe, 1913), etc...

l) Le *Bacillus pullorum* produisant la diarrhée blanche des poussins.

Toutes ces souches de Bacilles paratyphiques se différencient entre elles par leur provenance et par leur agglutinabilité.

Leurs caractères de culture ne permettent pas leur différenciation.

D'après Fischer, Manteufel et Beger, les bacilles du type Schottmüller donnent des colonies à bords surélevés, et administrés par voie digestive ne sont pas pathogènes pour la souris. Les Bacilles du type Aertrycke par contre sont pathogènes dans ces conditions

et n'ont pas de colonies caractéritsiques à bords surélevés.

Récemment Théobald et Dorothée Smith ont signalé que les Bacilles paratyphiques B Schottmüller et le Bacillus enteritidis Gärtner, développés en bouillon additionné de lactose (cultures âgées au moins de 4 jours) inhibent ultérieurement la fermentation de ce sucre par le Coli-bacille ensemencé dans ce même milieu ; les microbes du *Groupe Hog-choléra* et les représentants du *Groupe enteritidis Breslau* n'empêchent pas cette production de gaz.

D'après des recherches faites par d'autres chercheurs le phénomène observé par Th. et D. Smith est trop irrégulier pour servir de base à une classification.

La plupart des auteurs se sont attachés à grouper les diverses souches de *Bacilles paratyphiques B* d'après les résultats des épreuves de l'agglutination.

Dès le début, on les avait séparées en deux sous-groupes importants :

celu des *Bacilles paratyphiques B* Schottmüller et

celui de l'intoxication alimentaire ou type du *Bacillus enteritidis* Gärtner.

Dans la suite, les observations tant cliniques que sérologiques ont établi qu'il y avait lieu de distinguer encore dans l'ancien premier sous-groupe les *Bacilles paratyphiques B* Schottmüller et les *Bacilles enteritidis* Breslau avec notamment le *Bacille* d'Aertrycke comme type.

Enfin, Neukirch, Weil et Saxl ont isolé de malades atteints d'une affection paratyphique, un Bacille, qui, par ses caractères de cultures, se rapproche du Bacille paratyphique B, mais dont l'étude de l'antigène l'en différencie. Ils l'ont marqué dès lors du nom de *Bacillus paratyphus* β. Au point de vue de l'antigène il

est identique au *Bacille* de Voldagsen (*Salmonella* des porcs) et au *Bacille paratyphique C* isolé par Uhlenhuth.

Ces microbes présentent entre eux une certaine parenté et les recherches faites par Bail et Bruynoghe ont établi que ces germes ont pour la plupart de l'antigène thermolabile, et tous de l'antigène thermostabile.

La parenté qui existe entre ces Bacilles réside tantôt dans l'antigène thermolabile, tantôt dans l'antigène thermostabile, tantôt dans les deux.

Ce serait dépasser les limites de notre travail d'indiquer ici les résultats de ces recherches.

Nous avons ainsi exposé dans ses grandes lignes les propriétés différentielles des quatre Bactéries qui nous intéressent spécialement dans l'élaboration de notre sujet.

Dans les chapitres suivants nous aurons l'occasion de revenir sur les méthodes culturales employées habituellement en microbiologie pour caractériser ces différents organismes.

CHAPITRE DEUXIÈME

MILIEUX DE CULTURE EMPLOYÉS HABITUELLEMENT POUR CARACTÉRISER LE GROUPE COLI-TYPHIQUE

Si l'on envisage les techniques culturales employées généralement pour l'ensemencement et le développement des bactéries du groupe Coli-typhique, il nous semble que l'on peut diviser les milieux habituellement employés en deux grands groupes :

a) Les milieux généraux utilisés pour la culture de la plupart des bactéries, tels que le bouillon de viande, l'eau peptonée, la gélatine, la gélose, etc..., sur lesquels nos organismes végètent abondamment et d'une façon luxuriante.

b) Les milieux spécifiques adaptés spécialement aux propriétés culturales de ces bactéries. Ces techniques sont basées d'un côté sur le principe permettant l'isolement de ces germes à partir d'une culture où les autres germes ont été raréfiés ou sur les propriétés biochimiques typiques des bactéries du groupe Coli-typhique.

Nous ne croyons pas nécessaire d'insister ici sur les milieux généraux mentionnés dans le Groupe *a*) ci-dessus, étant donné que leur emploi est courant en

microbiologie et que nous avons donné antérieurement tous les détails sur le développement de nos germes sur ces milieux.

Quant aux milieux spécifiques, il nous semble qu'il est possible de les classer en différentes catégories dont nous pouvons établir l'ordre suivant :

1) Milieux à base d'hydrates de carbone.
2) Milieux basés sur le pouvoir réducteur des bactéries du groupe Coli-typhique.
3) Milieux à base d'antiseptiques.
4) Milieux à base de métaux ayant une influence spécifique sur ces germes.

1) Milieux à base d'hydrates de carbone.

Les milieux employés pour l'étude des propriétés biochimiques des bactéries du groupe Coli-typhique contiennent d'habitude soit du glucose, soit du lactose. Ces deux glucides sont utilisés pour les raisons que nous avons déjà données antérieurement : le Colibacille attaque seul le lactose, alors que les autres bactéries ne peuvent utiliser directement ce sucre. Les principaux milieux proposés et couramment employés en bactériologie sont : le milieu d'Endo, le milieu de Drigalski-Conradi, le milieu de Marchal, le milieu de Chandelier, le milieu de Gonzalès et de nombreux autres milieux présentant des modifications plus ou moins importantes des substrats sus-mentionnés.

Nous donnons ci-dessous les techniques de préparation des principaux milieux cités en insistant plus que ci-devant sur les modes opératoires et les principes d'utilisation de ces milieux.

Milieu d'Endo, modifié par Marchal.

1) Peptone de Witte	20 gr.
Gélose	30 »
Eau	1000 cc.

Ajuster à pH = 7,6, chauffer à l'ébullition et filtrer.

2) Solution alcoolique de fuchsine basique :

Fuchsine basique	0,2 gr.
Alcool à 95°	10 cc.

3) Solution aqueuse de sulfite de soude au 1/10 ;

4) Solution de lactose au 1/10 dans l'eau distillée.

Mode opératoire :

Mélanger à chaud après liquéfaction :

Gélose peptonée (1)	300 cc.
Solution alcoolique de fuchsine (2)	3 »
Solution de lactose (4)	30 »

Agiter et porter le tout à 90-95°. Dès que cette température est atteinte, ajouter par petites portions et en agitant :

Solution aqueuse de sulfite de soude (3) jusqu'à décoloration de la gélose fuchsinée,

Répartir en tubes de 10-15 cc., tyndaliser pendant trois jours de suite à + 100° pendant 45 minutes. Ce milieu se conserve d'une façon satisfaisante à l'obscurité.

Pour l'emploi on liquéfie ce milieu contenu dans les tubes au bain-marie et on le transvase dans des boîtes de Pétri préalablement stérilisées.

Interprétation des résultats. — Le Colibacille donne des colonies rouges à aspect métallique à la suite de production d'une réaction acide provenant de la

fermentation du lactose. Les acides mis en liberté agissent sur la combinaison incolore de la fuchsine-bisulfitée. Le Bacille typhique donne des colonies incolores dans les premières heures de la culture, plus tard ces colonies prennent un aspect légèrement rosé, comme la plupart des bactéries anodines n'attaquant pas le lactose.

Milieu de Drigalski-Conradi. — Préparer un bouillon peptoné :

1) Extrait de viande Liebig	10 gr.
Peptone de Witte	10 »
Nutrose	10 »
Chlorure de sodium	5 »
Eau	1000 cc.

Alcaliniser à pH = 7,8, faire bouillir et ajouter :

Gélose	30 gr.

Faire dissoudre à l'autoclave et filtrer.

2) Solution de lactose :

Lactose	30 gr.
Teinture de tournesol	300 cc.

Faire bouillir pendant 15 minutes.

3) Solution de soude :

NaOH	10 gr.
Eau distillée	100 cc.

Stériliser à l'autoclave.

4) Solution de Krystall-violet.

Krystall-violet	0,10 gr.
Eau distillée	100 cc.

Dissoudre à chaud.

Mode opératoire :

Mélanger le bouillon peptoné-gélosé après liquéfaction avec la teinture de tournesol lactosée. Agiter pour obtenir la formation de mousse et ajouter la solution de soude (3) jusqu'à teinte légèrement bleue de la mousse. A ce moment continuer encore à additionner 4 cc. de la solution de soude.

Agiter pour bien mélanger et ajouter la solution de krystall-violet (4) 20 cc.

Répartir en tubes de 10 à 15 cc. et conserver à l'obscurité hermétiquement bouchés. Au moment de l'emploi on transvase également après liquéfaction dans des boîtes de Pétri.

Interprétation des résultats. — Sur ce milieu le Bacille d'Eberth et les Paratyphiques donnent des colonies rondes ressemblant à des gouttes de rosée incolores ou légèrement bleuâtres, le Colibacille donne des colonies rouges par suite de la dégradation du lactose et la production des acides.

Milieu de Chandelier :

Préparer un bouillon gélosé à 30 ‰ ; ajouter 15 grammes de lactose et stériliser.

Préparer d'autre part une solution aqueuse de rouge-congo à 10 % et stériliser.

Mode opératoire :

Mélanger la solution de rouge-congo avec le bouillon gélosé à raison de 10 %.

Interprétation des résultats. — Le Colibacille donne sur ce milieu des colonies bleu-noirâtres, alors que le Bacille typhique et les paratyphiques donnent des colonies rouges foncées comme la plupart des Bactéries saprophytes n'attaquant pas le lactose.

Nous n'insistons pas davantage sur les milieux spécifiques à base d'hydrates de carbone, étant donné qu'à la suite de l'exposé précédent, où nous avons tenu compte des trois milieux essentiellement employés pour différencier les quatre bactéries qui nous intéressent, il nous est aisé de justifier notre manière de voir à ce sujet.

Observations critiques au sujet de l'emploi des milieux à base d'hydrates de carbone. — Si l'on envisage l'ensemble de ces procédés, on se rend compte que toutes ces méthodes sont basées sur les propriétés biochimiques spécifiques du Colibacille et ne tiennent compte qu'à ces seuls caractères. S'il est donc possible de différencier aisément le Colibacille de tous les autres germes microbiens au moyen de ces techniques, il nous semble par contre très difficile, sinon impossible, de mettre en évidence par la technique culturale seule, l'existence dans un substrat contaminé du Bacille d'Eberth ou des Salmonella.

Il faudrait donc, si l'on veut améliorer les moyens de différenciation de ces germes du Groupe Coli-typhique par les méthodes culturales, avoir recours à des techniques basées sur d'autres principes.

En considérant les milieux essentiels que nous venons de citer, nous croyons pouvoir recommander la méthode de Chandelier comme étant encore la plus judicieuse d'entre tous ces milieux, puisque sur le substrat au rouge-congo seul on note l'apparition de teintes bien

opposées, permettant à la rigueur de différencier le Bacille typhique des germes anodins habituels.

Les raisonnements que nous venons d'opposer à ces méthodes ont été soulevés par de nombreux autres chercheurs sans avoir été nettement formulés. Ceci ressort des multiples autres techniques ayant été élaborées pour l'étude de ces Bactéries, basées sur des principes différents ainsi que nous l'avons déjà signalé plus haut. Une de ces méthodes est basée sur le pouvoir réducteur des bactéries du groupe Coli-typhique.

2) Milieux basés sur le pouvoir réducteur des bactéries du groupe coli-typhique.

Nous avons l'habitude en microbiologie, depuis les travaux de Grimbert, de diviser un certain nombre de germes bactériens qui sont aptes à effectuer une réduction des nitrates présents dans les substrats, en deux catégories :

I) des ferments dénitrifiants vrais,

II) des ferments dénitrifiants indirects.

Les ferments dénitrifiants indirects sont aptes à décomposer les nitrates à condition de trouver dans le substrat des complexes protidiques spéciaux et surtout des composés amidés. Le Colibacille fait partie de ces ferments dénitrifiants indirects d'après Grimbert.

Cet auteur croit que la différence provient de la présence de substances amidées sur lesquelles agit l'acide nitreux résultant de la réduction du nitrate par la Bactérie. Le volume du gaz dégagé par l'action microbienne est au moins double de celui qui correspond au poids de l'azote du nitrate détruit. Par contre, chez les ferments dénitrifiants vrais tels que le Bacille pyocya-

nique, le volume d'azote libéré correspond exactement au poids du nitrate détruit et les produits amidés présents dans le substrat n'interviennent pas dans la réaction.

On voit donc que chez les ferments dénitrifiants indirects on a à faire avec une réaction semblable à celle que l'on utilise couramment en chimie biologique pour le dosage de l'azote amidé par la méthode de Yovanovitch.

Les milieux de culture employés pour mettre en évidence ces propriétés contiennent soit du Nitrate de potassium soit du Nitrate de sodium, avec addition de peptone. Grimbert mentionne qu'il y a une variation suivant que l'on utilise des matières protidiques différentes à savoir : de la peptone ou de l'extrait de viande.

Pour vérifier l'exactitude de cette manière de voir, nous avons effectué des expériences à l'aide de milieux de cultures contenant d'un côté de la peptone, de l'autre côté de l'extrait de viande et en troisième lieu des produits amidés synthétiques, tels que l'acide aspartique, l'asparagine et la lysine, contenant donc la fonction amidée soit seule, soit associée à un groupement d'azote d'une autre fonction présent dans la molécule.

Lors de ces recherches, nous n'avons pas pu constater une différence marquée de l'action du Colibacille ou du Bacille typhique quant à l'action dénitrifiante. D'ailleurs, il nous semble que les observations indiquées par Grimbert ne sont pas justifiables étant donné que dans la peptone il y a également présence de groupements amidés.

L'action dénitrifiante des Bactéries du groupe Coli-typhique ne peut donc pas servir de test pour différencier ces bactéries entre elles et d'avec les autres.

Une autre réaction basée sur les propriétés réductrices des bactéries est celle au moyen du rouge neutre.

Le rouge neutre est le Chlorhydrate de diméthyl-diamidotoluphénazine asymétrique qui sous l'action des alcalis, perd sa coloration rouge pour prendre une teinte jaune. Le mélange traité par l'alcool ou l'éther est doué d'une fluorescence verte.

On prépare un bouillon peptoné auquel on ajoute 5 grammes de glucose par litre et on introduit le rouge-neutre à raison de 0,5 gr. pour mille. On stérilise à 115° pendant 30 minutes.

On obtient ainsi un bouillon nettement coloré en rouge. Le Colibacille ensemencé sur ce milieu se développe d'une façon luxuriante et dès les premières 24 heures on aperçoit un virage de la teinte rouge au jaune et une fluorescence verte très caractéristique.

Ces caractères sont identiques pour les Typhiques et les Salmonella à condition d'utiliser un milieu à base de glucose. Par contre, l'introduction du lactose à la place du glucose permet une différenciation entre les deux sortes de bactéries.

A cette technique on peut opposer les raisonnements suivants :

Le diagnostic du Colibacille au moyen d'un milieu au rouge-neutre lactosé est très problématique étant donné qu'un grand nombre d'autres bactéries, telles que le Pneumobacille de Friedlander produisent absolument les mêmes réactions.

D'autre part, le virage du rouge-neutre vers une teinte jaune s'effectue « in vitro » sous l'action des alcalis, alors que dans notre milieu glucosé ou lactosé le Colibacille produit manifestement une réaction acide. Il faut donc se demander si effectivement le phénomène réactionnel qui se manifeste par le développement de

ces bactéries sur le milieu au rouge-neutre est effectivement le résultat d'une réduction du colorant.

Nous voyons donc que ces problèmes sont loin d'être résolus et ne permettent guère d'établir un diagnostic différentiel certain des différentes bactéries en question au moyen de méthodes culturales.

3) **Milieux à base d'antiseptiques.**

On sait, tel que le mentionne Quibin, que la vitalité des Bactéries est défavorablement influencée par une foule de substances chimiques dites antiseptiques. La dose d'antiseptiques varie dans de larges limites suivant que l'on désire simplement arrêter ou ralentir le développement d'un germe déterminé, ou bien que l'on cherche à le détruire. Elle varie aussi suivant les milieux employés et suivant la température.

A ce sujet, S. Lambin a parfaitement mis en valeur l'influence exercée sur l'activité germicide par les propriétés de la substance désinfectante. Dans cette action il faut faire entrer en ligne de compte, la qualité et la quantité des germes en expérience, le milieu de suspension des germes, la nature du milieu intermédiaire de l'essai, la température, le temps d'action du désinfectant et les propriétés antigénétiques de la substance étudiée.

L'auteur a fixé pour 3 antiseptiques pris comme type, le Bichlorure de Mercure, le Phénol et l'Iode, une technique particulière pour la détermination de la mesure de la valeur antibiotique des antiseptiques sur les germes.

Les sels biliaires : tauro-cholate et glycocholate de soude, la bile elle-même ont été ajoutés à certains mi-

lieux dans le but d'arrêter le développement de certains germes, tout en favorisant les cultures de Colibacille.

On a utilisé dans le même but, c'est-à-dire pour isoler le Colibacille avec d'autres germes, des composés tels que l'acide arsénieux, la caféine seule et additionnée de krystall-violet.

L'acide phénique à la dose de 1 gramme par litre de bouillon et à la température de 40 à 41° C passe pour un moyen excellent d'isolement pour la recherche du Colibacille dans l'eau et dans les liquides physiologiques.

En France, pour cultiver, identifier et numérer le Colibacille, on se sert généralement de la méthode de Vincent.

La culture est basée sur la propriété du Colibacille de se développer dans une eau peptonée légèrement phéniquée et à la température de 42° ; l'acide phénique et la température de 42° étant des conditions dysgénésiques pour de nombreux germes banaux.

Nous rapportons ici la préparation et la composition du milieu de Chantemesse, comme milieu-type à base d'antiseptiques :

Milieu de chantemesse :

Peptone pancréatique	3 gr.
Lactose	2 »
Gélose	2 »
Eau	100 cc.

Alcaliniser à *p*H = 7,6, chauffer pour dissoudre la gélose et précipiter les phosphates alcalino-terreux, filtrer et stériliser.

Au moment de l'emploi, liquéfier ce milieu, répartir dans des tubes de 10 à 15 cc. préalablement stérilisés,

et ajouter dans chaque tube à raison de 10 cc. du milieu et avant de couler en plaques :

Acide phénique cristallisable liquéfié en solution à 3 % ..	4 gouttes
Teinture de tournesol stérile	1 cc.

Ce milieu convient surtout à l'isolement du Colibacille. Cette bactérie y pousse en colonies rouges, tandis que le Bacille d'Eberth et les Paratyphiques s'y développent par des colonies incolores ou blanchâtres comme la plupart des autres Bactéries qui n'attaquent pas le lactose et qui sont insensibles à l'action de l'acide phénique. Les objections que l'on peut formuler à l'égard de cette méthode sont les mêmes que celles que nous avons formulées au sujet des autres milieux à base d'hydrates de carbone.

Quant à la critique générale de la méthode de Vincent, nous nous rapportons à l'exposé de Fleury qui les détermine de la façon suivante :

« L'identification est simple : examen microscopique, Gram, réaction de l'indol, fermentation de la gélose lactosée tournesolée et du bouillon glucosé, coagulation du lait, etc..., tous procédés classiques sur lesquels nous n'avons pas à nous étendre.

La numération se base sur cette hypothèse vérifiée, d'ailleurs expérimentalement dans l'immense majorité des cas, qu'une colonie est produite par un seul germe.

En somme, dans son principe, la méthode de Vincent consiste à faire l'ensemencement du Colibacille dans un milieu sélectif, où il prolifèrera mieux et plus vite que les autres germes. De cette culture primaire, on fait un prélèvement qu'on ensemence sur des milieux solides, sur lesquels, il sera facile d'isoler le Bacille. »

C'est ainsi que, dans la plupart des laboratoires français, et notamment dans les laboratoires munici-

paux, on procède à la recherche du Colibacille dans les eaux.

Avec d'autres bactériologistes, nous avons pensé que cette méthode, si elle est commode et rapide, n'est pas à l'abri de toute critique :

D'abord, comme dans tous les milieux liquides, il y a lieu de tenir compte de la concurrence vitale, et il faut se méfier de certains bacilles qui, poussant plus mal et moins vite que d'autres, sont étouffés par ces derniers, plus prolifiques, de sorte qu'on ne peut plus les isoler du liquide de culture.

Ensuite, la température de culture (42°) nous paraît élevée, et nous craignons une action inhibitrice, si faible soit-elle, s'apparentant à l'action des antiseptiques.

Enfin et surtout, l'acide phénique a un pouvoir inhibiteur incontestable. C'est ainsi que nous montrons qu'un gramme d'acide phénique ajouté à 1.000 grammes de certains milieux liquides empêche toute culture.

Il n'est donc pas impossible que dans les milieux phéniqués le Colibacille soit, au moins dans certains cas, bactériologiquement en sommeil et inerte, et que, pour nous révéler son existence, il ait besoin d'être transposé dans un milieu plus favorable, par exemple dans l'intestin, où il se réveillera et se retrouvera avec toutes ses propriétés.

Ainsi peut-il arriver de conclure à l'absence du Colibacille dans une eau, alors que cette eau, en réalité, en contient.

Diénert et Etrillart, exposant les causes d'erreur de la méthode de Vincent, vont même jusqu'à écrire qu'avec cette méthode ils ont « maintes fois obtenu des résultats négatifs pour le Colibacille avec des eaux manifestement contaminées ».

Pour isoler le Colibacille, nous avons donc cherché

des milieux qui ne présentent pas les inconvénients cités plus haut.

Fleury, à la suite de ses recherches, a établi le milieu suivant pour l'isolement et la culture du Colibacille :

Milieu de Fleury.

Peptone	30 gr.
Lactose	15 »
Gélose	15 »
Gélatine	60 »
Chlorure de sodium	900 cc.

Après dissolution et neutralisation, clarifier au blanc d'œuf, filtrer et ramener à 900 cc.

Ajouter à la solution filtrée :

Rouge-Congo	2 gr.
Lessive de soude	0,5 cc.
Eau distillée	100 cc.

Mélanger, répartir en plaques de Roux à raison de 15 cc. par plaque. Stériliser à + 105° pendant une demi-heure. Au moment du besoin, faire liquéfier au bain-marie à + 42° environ.

Les colonies de Colibacilles apparaissent sous forme de taches bleu-claires sur fond rouge-groseille. Les colonies du Bacille typhique se détachent en rouge-foncé et sont beaucoup plus petites que celles du Colibacille.

Les objections à cette méthode peuvent être rangées avec celles que nous avons formulées antérieurement.

Ceci ressort aussi des travaux de Diénert et Etrillard qui à la suite d'une étude très approfondie de la stérilisation par le chlore, sont arrivés après avoir obtenu des résultats contradictoires, à la conclusion qu'il fallait opérer pour la recherche du Colibacille dans les eaux avec un autre milieu que le bouillon phéniqué.

Après l'étude de nombreux milieux ils se sont arrêtés à celui de Teague qu'ils emploient de la façon suivante :

Milieu de Teague :

Peptone	10 gr.
Phosphate dipotassique	2 »
Gélose	15 »
Eau distillée	1000 cc.

Ajuster le milieu au $pH = 7,5$, chauffer pour dissoudre la gélose et précipiter les phosphates alcalino-terreux. Répartir après filtration et stériliser.

Au moment de l'emploi, on ajoute à 100 cc. de cette gélose :

Lactose	à 20 %,	5 cc.
Éosine	à 2 %,	2 cc.
Bleu de méthylène	à 0,5 %,	2 cc.

Couler en boîtes de Pétri après avoir soigneusement et stérilement mélangé à raison de 25 cc. par plaque.

Pour l'emploi des 100 cc. d'eau à analyser, tel que l'instruction du 12 juillet 1924 le préconise, Diénert et Etrillard recommandent le procédé suivant :

On concentre les germes de l'eau à l'aide d'un coagulant qui est l'aluminium-neutre avec 70 % d'eau, préparée par voie humide et stérile, contenue dans une fiole et que l'on introduit dans l'eau à raison de 20 cc. pour 1000 cc. d'eau. On agite énergiquement l'eau additionnée d'aluminium et on laisse déposer dans un endroit frais pendant deux heures. Ceci fait, on soutire par siphonage stérile le liquide surnageant le précipité et on centrifuge ce dernier.

On a ainsi dans un tube un culot d'aluminium contenant 90 à 95 % de germes de Colibacille contenus dans 1000 cc. d'eau.

Ce culot d'aluminium est alors mélangé à la température de + 30° avec 20 cc. d'un mélange de 1/3 de gélose de Teague et de 2/3 de gélatine de Teague. On agite bien et on coule en plaques de Pétri contenant déjà 25 cc. de gélose de Teague stérile et solidifiée à raison de 2 cc. par plaque.

Les auteurs indiquent comme avantages de leur technique un ensemencement à faible température et un étalement sur gélose d'une faible quantité du milieu ensemencé, par conséquent des colonies très superficielles.

Sur ce milieu le Colibacille donne des colonies bleu-sombre, presque noires. Les colonies appartenant au groupe *Bacillus lactis aerogenès* sont plus larges que celles du Colibacille et ont une teinte brun-foncé.

Par cette méthode les deux auteurs ont pu compter et identifier dans 5 cc. d'eau brute de la Seine 15 colonies de Colibacille alors que le même volume d'eau ensemencé sur bouillon phéniqué a seulement accusé la présence de deux Colibacilles.

La même méthode peut être utilisée pour la recherche du Bacille d'Eberth qui apparaît sous forme de colonies rouge-vif. Toutefois ces colonies rouges ne sont pas la majorité, elles paraissent être les représentants du type S du Bacille d'Eberth des Américains. Le type R donne des colonies bleu-clair qui, d'après les auteurs, seraient faciles à différencier de celles du Colibacille

On voit donc que même cette technique assez compliquée ne mène pas au but. C'est pour cette raison que nous avons cru justifier l'origine de nos recherches.

4) Milieux à base de métaux ayant une influence spécifique sur les bactéries du groupe coli-typhique.

A la suite des recherches pour trouver un milieu spécifique permettant la différenciation entre les différents germes du Groupe Coli-typhique on a remarqué que le Colibacille libère dans certaines conditions le fer de ses combinaisons et ce ion libéré agit ensuite sur les réactifs ordinairement employés pour caractériser sa présence.

Léon Muller a ainsi constaté que certains composés du fer contiennent ce métal à l'état dissimulé et les réactifs classiques ne donnent pas avec eux les réactions caractéristiques. Ceci est particulièrement le cas pour le malate de fer, l'iodure de fer lactosé, le saccharate de fer, etc..., mais sous l'action de certains facteurs l'ion métallique peut être libéré et sa présence peut alors être caractérisée par les réactions classiques du fer. L'auteur a ainsi établi un milieu spécifique pour caractériser le développement du Colibacille, qui par son activité met justement en liberté le fer contenu dans du malate de fer introduit dans le milieu, La composition de ce milieu est la suivante :

Milieu de Léon Muller.

Extrait de fer pommé au 1/10	30 cc.
Ferrocyanure de potassium au 1/10	40 cc.
Lactose	25 gr.
Bouillon de viande.....	1000 cc.

Alcaliniser le tout au moyen de 10 °/oo de soude normale.

Sur ce milieu le Colibacille donne un liquide trouble à reflets bleuâtres et un dépôt bleu-foncé.

Par l'emploi d'une gélose alcalinisée à 10 °/oo au lieu

du bouillon, le Colibacille colore le milieu en vert, tandis que le Bacille typhique donne un voile blanchâtre. Grâce à ces milieux de culture, l'auteur a pu déceler le Colibacille dans des cas où d'autres procédés de culture avaient échoué.

Cette technique est donc très recommandable pour différencier le Colibacille ; les autres Bactéries du même groupe ne se différencient cependant nullement de la plupart des germes anodins réquemment présents dans les liquides souillés.

Nous tenons à rapporter ici un fait qui jusqu'à présent n'a pas fait, à notre connaissance, l'objet d'une étude approfondie. L'emploi d'un milieu végétal à base d'artichauts est assez courant en France pour le diagnostic du Colibacille. En effet, il apparaît sur l'artichaut au bout de vingt-quatre heures une coloration verte due au développement du Colibacille qui envahit toute la partie charnue de la plante et en même temps il se développe un enduit jaune et luisant sur sa surface. Cette coloration est due à la mise en liberté du fer contenu sous une forme dissimulée et en combinaison organique spéciale dans ce végétal.

Un autre milieu proposé est basé sur l'action du Colibacille sur certains sels de plomb. Diénert, Guillerd et A. Leguen ont montré comment on pouvait utiliser la gélose additionnée de sous-acétate de plomb pour isoler le Bacille d'Eberth et le paratyphique B. Un mélange de Colibacille et de Bacille d'Eberth dans une eau se caractérise très facilement sur la gélose au plomb : le premier donne des colonies incolores, le second des colonies noires.

La recherche des colonies noircissant sur la gélose au plomb se fait dans une eau de la façon suivante, comme nous l'avons déjà mentionné :

Milieu de gélose au plomb :

Gélose	15 gr.
Peptone	30 »
Eau ordinaire	1000 cc.

Ajouter au moment de l'emploi, après avoir ajusté le pH = 7,5, 10 cc. d'une solution au 1/10 de sous-acétate de plomb du Codex.

Nous donnons ci-contre la technique pour la concentration des germes dans l'eau adaptée à cette méthode : Prendre 1.000 cc. d'eau, y ajouter 10 grammes d'une solution d'aluminium gélatineux pur. Celle-ci est obtenue en précipitant 1 gramme de sulfate d'alumine dissous dans 1.000 cc. en présence d'ammoniaque. On récolte le précipité, on le lave pour éliminer l'ammoniaque et on stérilise ce dépôt.

On agite bien le mélange : eau à analyser et aluminium. On laisse reposer de deux à quatre heures. On décante le liquide, on centrifuge le dépôt que l'on ensemence sur plusieurs plaques de gélose au sous-acétate de plomb. On peut remplacer le sous-acétate de plomb par l'acétate de plomb.

Cette réaction se manifeste en présence de certaines Bactéries du groupe Coli-typhique par l'apparition d'une coloration noire due à la formation de sulfure de plomb. Il s'agit en l'occurrence d'une action de réduction par mise en liberté d'hydrogène sulfuré et action de ce composé sur le sel de plomb introduit dans le milieu.

Ce phénomène se traduit d'une façon plus ou moins incertaine suivant les différents auteurs en présence du Colibacille. L'étude de ce phénomène et son instabilité ont fait l'objet d'un travail très intéressant élaboré par Quirin.

C'est en somme la suite de ce travail que nous entreprenons dans les présentes recherches et le travail de Quirin constitue la base de notre étude.

Avant d'entrer dans le vif du sujet, nous tenons à faire remarquer qu'il n'est pas étonnant de trouver une contradiction assez marquée au sujet du *milieu au plomb*, car si l'on étudie consciencieusement la formule de préparation de ce milieu que nous venons de citer plus haut et que nous avons emprunté à Calmette, Boquet et Nègre et qui constitue en somme la formule classique que l'on emploie couramment dans les laboratoires de microbiologie, on est frappé par la présence d'un seul des corps entrant en réaction, c'est-à-dire le sel de plomb et par l'absence de toute trace de ion de soufre nettement défini.

Ce corps, qui est le réactif principal entrant en action par l'influence des germes bactériens, est représenté uniquement par le taux en soufre contenu dans l'eau ou dans les autres produits nutritifs introduits dans le milieu de culture. On conçoit facilement que cette quantité de soufre est par conséquent très variable et peut exister en plus ou moins grande quantité et sous des formes chimiques (combinaisons chimiques) tout à fait différentes. On peut alors se demander si les résultats négatifs obtenus dans certains cas ne tiennent pas précisément soit à l'absence totale soit à la présence d'une quantité trop faible, soit à une combinaison chimique inattaquable de l'élément soufre dans les milieux mis en expérience.

D'autre part, Quirin se pose la question sous quelle forme chimique se trouve engagé le métalloïde présent dans le substrat, et dissocié ou non par le Colibacille pour aboutir ou non à la formation de sulfure de plomb.

En outre, on peut se demander si la présence d'élé-

ments en voie de dissociation acides ou basiques, mis en liberté dans le milieu de culture par l'action du Colibacille ou d'un autre germe de ce groupe n'est pas un obstacle à l'apparition de l'hydrogène sulfuré.

C'est pour ces raisons que nous avons jugé intéressant d'entreprendre nos recherches et de les effectuer avec des milieux contenant l'ion soufre sous une forme nettement définie et à l'état de pureté absolue.

Dans les Chapitres suivants nous exposerons les détails de nos travaux personnels effectués dans le but de tirer au clair ce problème.

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE TROISIÈME

PRÉPARATION DES MILIEUX AU PLOMB ET MÉTHODES DE DOSAGE DU SOUFRE

Pour l'élaboration de notre travail nous avons eu recours à deux catégories de milieux de cultures.

Au début nous avons utilisé des milieux de cultures à base de viande tels que l'on les utilise généralement en bactériologie, et ceci principalement pour étudier le métabolisme du ion soufre des différentes souches de bactéries que nous avons employées au cours de nos travaux.

A ce sujet nous avons tout d'abord eu recours à un milieu de jus de viande.

Préparation de la macération de viande

Viande	500 grammes
Eau ordinaire	1000 cc.

Débarrasser la viande des tendons et de la graisse, puis la couper en morceaux et faire macérer le tout

pendant douze heures à la température du laboratoire.

Porter ensuite à l'ébullition pendant une heure, filtrer sur papier mouillé pour retenir les graisses. Ajouter au liquide filtré :

Peptone	10 grammes
Chlorure de sodium	5 »
Gélose	25 »

Faire fondre la gélose en chauffant le liquide à l'autoclave pendant 10 minutes à + 110°.

Alcaliniser avec de la soude diluée jusqu'à pH = 7,6. Porter à l'ébullition pour précipiter les phosphates alcalino-terreux. Filtrer à chaud et répartir en tubes à raison de 10 à 15 cc. que l'on stérilise pendant vingt minutes à + 115°.

Nous tenons à faire remarquer que nous avons effectué nos dosages du soufre au moyen du bouillon de viande ci-dessus décrit, mais ne contenant pas de gélose.

D'autre part, pour étudier avec toutes les rigueurs nécessaires le métabolisme des composés soufrés contenus dans notre milieu, nous avons divisé chaque fois la portion de viande servant à la préparation du milieu en deux parties égales dont l'une nous servait à la préparation d'un milieu à base d'eau ordinaire prélevée à la conduite d'eau de la ville de Clermont-Ferrand, tandis que l'autre a été réservée à une macération dans de l'eau bi-distillée.

Nous avons donc opéré de cette façon avec deux séries de milieux ne différant que par la nature de l'eau employée.

Après avoir constaté au moyen de ces milieux l'influence du développement de nos différentes bactéries sur la transformation et l'assimilation des composés soufrés et ayant été ainsi fixé sur le métabolisme du

soufre minéral et organique, nous avons poussé plus loin nos investigations en employant des milieux de culture ne contenant que des produits synthétiques purs, mis en solution dans de l'eau bi-distillée et renfermant l'ion soufre sous une forme chimique nettement définie et en quantité préalablement dosée.

Dans ce but nous avons tout d'abord employé le milieu de Lasseur.

MILIEU GÉNÉRAL DE LASSEUR

Asparagine	9 grammes
Glycérine	25 »
Phosphate bipotassique	2 gr. 5
Sulfate de magnésie	5 —
Chlorure de calcium	0 gr. 40
Sulfate ferreux	0 gr. 10
Gélose	25 —
Eau bidistillée	1000 cc.

Répartir ce milieu après les manipulations classiques d'alcalinisation et de filtration dans des tubes à raison de 5 cc. Au moment de l'emploi, liquéfier la gélose au bain-marie et laisser refroidir à + 45° environ.

Ajouter alors à chaque tube :

1) Solution de sous-acétate de plomb au 1/10 ...	0,1 cc.
2) Solution d'hyposulfite de soude au 1/1000....	0,5 cc.

Mélanger bien et laisser refroidir en culot.

Les deux solutions d'hyposulfite et de sous-acétate de plomb doivent être préalablement stérilisées.

D'autre part, nous avons préparé le même milieu, mais à la place de la solution d'hyposulfite de soude, nous avons utilisé une solution de *l*-cystine à 1/500 = 0,5 cc.

Pour chaque expérience nous avons préparé 8 tubes de culture et ceci pour chacun des deux milieux.

Nous avons donc mis en œuvre pour chaque souche examinée 8 tubes de milieu au plomb à l'hyposulfite de soude et 8 tubes de milieu au plomb à la cystine.

On ensemence largement chaque fois deux tubes d'une même série de milieu, en longeant à l'aide du fil de platine chargé du prélèvement, le long des parois des tubes, pour effectuer le repiquage entre le verre et le milieu gélosé.

Chaque série d'examens a été pratiquée au moyen de souches différentes de Colibacille, de Bacille typhique, de Bacille paratyphique A, et de Bacille paratyphique B.

Les prélèvements ont été effectués à partir d'une culture sur gélose inclinée ordinaire âgée de quatre jours.

Après avoir opéré nos expériences au moyen des milieux précédemment indiqués, contenant à la fois du soufre sous forme minérale à l'état de sels sulfureux ou sulfuriques ou à la fois sous forme minérale à l'état sulfurique et sous forme organique, nous avons jugé nécessaire de modifier encore notre milieu de base en supprimant les sulfates minéraux contenus dans le milieu de Lasseur et en ne travaillant par conséquent qu'avec deux séries de substrats synthétiques ne contenant le soufre que sous la forme d'hyposulfite ou sous celle de cystine.

Nous exposerons par la suite les méthodes de dosages au soufre libre et combiné utilisées au cours de notre travail.

CHAPITRE QUATRIÈME

TECHNIQUE DES DOSAGES DU SOUFRE

En considérant les nombreuses techniques élaborées pour doser les différents corps intéressant la chimie biologique, il semble qu'il n'y en ait point de mieux étudiée et de plus classique que celle du dosage du soufre.

Si l'on envisage le problème au point de vue chimique, on peut distinguer en premier lieu le soufre minéral et en deuxième lieu le soufre non-minéral existant dans nos substrats bactériologiques.

En étudiant la question de plus près, on peut déterminer le soufre existant sous les formes chimiques différentes suivantes :

a) les sulfates minéraux ;

b) le soufre des éthers sulfatés ;

c) le soufre complètement oxydé ;

d) le soufre incomplètement oxydé ;

e) le soufre sulfo-conjugué ;

f) le soufre des combinaisons organiques, non-dissociables directement ;

g) finalement, le soufre total.

Girgis, dans son travail sur le dosage du soufre de l'urine envisage le problème de la façon suivante :

« Le dosage des sulfates minéraux proprement dits est effectué par précipitation des sulfates à l'état de

sulfate de baryum. Deux méthodes de dosage sont à retenir :

a) La meilleure, mais aussi la plus longue et la plus délicate, consiste à recueillir le précipité formé sur un filtre pondéral, à le calciner, et à déterminer son poids ; ces opérations qui nécessitent plusieurs heures pour être exécutées, donnent des résultats très exacts.

b) Une autre méthode, s'inspirant de celle de Marty (dosage des sulfates dans les vins), ne présente pas autant d'exactitude que la précédente, mais a l'avantage d'être plus rapide.

Dosage des sulfates sulfo-conjugués :

Il faut d'abord libérer l'acide sulfo-conjugué, puis le décomposer en acide sulfurique et phénol, car le phénylsulfate de baryum est soluble.

Pour décomposer, porter le liquide à ébullition avec un peu d'acide chlorhydrique au bain-marie, et un excès de chlorure de baryum.

Destruction des matières organiques : Girgis énumère ensuite les principaux mélanges oxydants en indiquant la manière dont ils sont utilisés :

a) mélange de carbonate de soude et de nitrate de potasse,

b) permanganate de potasse et acide phosphorique,

c) permanganate de potasse, acides nitrique et sulfurique,

d) eau régale,

e) acide chromique ».

Il dit qu'il est intéressant d'avoir un mélange oxydant qui permet d'obtenir outre la destruction des matières organiques, la minéralisation complète du soufre, et il recommande à cet effet la méthode au chlorate de potasse et acide chlorhydrique d'un côté et celle de l'acide perchlorique de l'autre côté, en donnant la pré-

férence à la première technique qui est plus commode, plus rapide et détruit mieux les sulfo-dérivés complexes qui paraissent particulièrement difficiles à minéraliser.

En envisageant nos substrats de cultures on sait que le soufre minéral y est représenté par une petite quantité de sulfate alcalin et de sulfate calcique. Ces corps sont précipitables par le chlorure de baryum en milieu acide.

Le soufre non-précipitable directement par le chlorure de baryum est lié par des combinaisons organiques qu'il faut dissocier au préalable pour l'amener à un état susceptible de subir ultérieurement l'action du réactif précipitant.

Les méthodes de dissociation des matières organiques renfermant l'élément minéral se ramènent donc, comme nous l'avons déjà exposé, à une oxydation énergique occasionnant la destruction de ces substances organiques et aboutissant à la solubilisation de l'ion recherché et mis en état d'être mesuré.

Afin de mettre au point les méthodes sûres et nous donnant toutes garanties d'exactitude, nous avons effectué tout d'abord des recherches préliminaires à l'aide de solutions d'acide sulfurique pur de titres connus.

Pour le dosage de cet acide sulfurique et par conséquent des sulfates minéraux, nous avions à notre disposition deux méthodes :

1° La méthode employant le chlorure de baryum en milieu acide.

2° La méthode à la benzidine.

Notre choix s'est finalement arrêté à cette dernière technique qui est basée sur le principe suivant : la benzidine étant une base faible donne des sels fortement dissociables par hydrolyse, ce qui permet de faire

un dosage très précis de l'acide sulfurique dissocié en employant comme indicateur la phénolphtaléine.

Dans un Erlenmeyer on introduit 25 cc. du substrat à examiner que l'on additionne goutte à goutte d'acide chlorhydrique à 25 % jusqu'à franche coloration bleue du papier au rouge-congo. On ajoute ensuite lentement 100 cc. d'une solution de benzidine préparée de la façon suivante :

Solution de Chlorhydrate de benzidine :

Benzidine pure	40 grammes
Acide chlorhydrique concentré	50 cc.
Eau distillée.....	1000 cc.

Mode opératoire :

Mettre la benzidine dans un mortier et ajouter peu à peu l'acide chlorhydrique en triturant énergiquement pour préparer une pâte que l'on laisse reposer pendant six heures. Puis on ajoute au fur et à mesure, l'eau distillée et on abandonne le tout pendant douze heures. Au bout de ce temps on agite pour obtenir la solution mère que l'on conserve dans un endroit obscur et que l'on emploie pour le dosage au taux de 1/10.

La solution au 1/10 est ajoutée à raison de 100 cc. au mélange « substrat à examiner plus acide chlorhydrique », on agite et on laisse reposer pendant quelques minutes.

Il se forme un précipité constitué par de fines aiguilles soyeuses que l'on recueille par filtration. On lave l'Erlenmeyer et le filtre avec de l'eau distillée, saturée de benzidine et on reporte le précipité et le filtre dans l'Erlenmeyer, on y ajoute 20 à 30 cc. d'eau et on porte à l'ébullition ; puis on retire du feu et on laisse refroidir. Puis on titre au moyen d'une solution décinormale de

potasse en présence de quelques gouttes de phénolphtaléine, jusqu'à coloration rouge. 1 cc. de la solution décinormale de potasse correspond à 49 milligrammes d'acide sulfurique.

Dosage du soufre non minéral

Pour effectuer ce dosage, nous rappellerons tout d'abord le procédé de Folin modifié par Abderhalden et Funck qui consiste à oxyder les complexes sulfurés par le bioxyde de sodium en chauffant au rouge. On laisse refroidir et on reprend par l'acide chlorhydrique dilué qui transforme le soufre à l'état de sulfate soluble.

Cette méthode a été fortement critiquée, car on a constaté une perte par dégagement d'hydrogène sulfuré lorsqu'on fait agir l'acide chlorhydrique sur la masse fondue.

C'est pour ces raisons que Lesure et Thomas ont modifié cette technique en utilisant comme mélange oxydant l'emploi de l'acide acétique et de l'eau oxygénée concentrée (perhydrol). C'est cette technique que nous avons utilisée pour le dosage du soufre des complexes organiques contenus dans nos milieux de cultures.

Le mode opératoire est le suivant :

Milieu de culture	200 cc.
Acide azotique fumant pur.....	10 gouttes

Évaporer à consistance siropeuse, puis ajouter encore 10 gouttes d'acide azotique fumant pur.

Placer sous la hotte dans un ballon de Kjeldahl

et chauffer doucement à feu nu jusqu'à ce que le dégagement des gaz nitreux soit terminé.

Ajouter goutte à goutte deux à trois centimètres cubes d'eau oxygénée à 110 volumes, exempte de soufre. Continuer à chauffer légèrement jusqu'à obtention d'un liquide incolore que l'on évapore à sec au bain-marie.

Reprendre le résidu par quelques centimètres cubes d'acide chlorhydrique dilué et ajouter la solution de chlorure de baryum en excès. Un nouveau dosage à l'état de sulfate de baryum donne le chiffre du soufre total comprenant le soufre minéral soluble et le soufre organique. A la place du dosage à l'état de sulfate de baryum nous avons aussi employé la méthode à la benzidine.

Par différence entre le résultat du soufre total et celui du soufre minéral on obtient celui du soufre organique.

Ces résultats sont évalués dans nos recherches en soufre pour 100 cc. de milieu.

Les substrats employés ont été, comme nous l'avons exposé précédemment, des bouillons de viande et des milieux synthétiques à base d'acides aminés contenant le soufre sous forme de sulfates, de sulfites et de polypeptides.

Nous donnons les résultats de ces expériences dans le tableau suivant :

TABLEAU

Valeurs des taux de soufre dosés dans nos dif érents milieux de culture

	Soufre total en grammes	Soufre minéral en grammes	Soufre organique en grammes
Bouillons à l'eau ordinaire :			
N° 1	0,0476	0,0236	0,0240
N° 2	0,0267	0,0123	0,0144
N° 3	0,0508	0,0263	0,0245
N° 4	0,0355	0,0098	0,0257
Bouillons à l'eau distillée :			
N° 1	0,0457	0,0177	0,0280
N° 2	0,0256	0,0076	0,0180
N° 3	0,0485	0,0203	0,0282
N° 4	0,0330	0,0068	0,0262
Milieux de Lasseur à l'eau distillée :			
N° 1	0,1425	0,1392	0,0033
N° 2	0,1437	0,1390	0,0047
N° 3	0,1362	0,1333	0,0029
N° 4	0,1347	0,1342	0,0005
Milieux de Lasseur à l'eau ordinaire :			
N° 1	0,1586	0,1512	0,0074
N° 2	0,1488	0,1445	0,0043
N° 3	0,1615	0,1523	0,0092
N° 4	0,1602	0,1545	0,0057

Observations résultant de nos expériences préliminaires

En considérant ce tableau on se rend tout d'abord compte de la grande différence du taux de soufre dans les milieux à base de viande et ceux préparés synthétiquement d'après la formule de LASSEUR.

Quant aux bouil'ons de viande on remarque, comme Quirin l'a déjà observé, que le taux du soufre varie dans ces substrats dans des limites relativement considérables ; ces différences doivent provenir de la chair musculaire utilisée dans la préparation.

Dans tous nos milieux l'élément soufre était présent, mais la grande variation démontre nettement qu'en travaillant par exemple avec des bouillons à l'extrait de viande, ce corps formant le réactif principal dans la réaction « au plomb », peut faire complètement défaut.

Comme nous l'avions indiqué plus haut, le soufre existe dans les bouillons de viande sous deux formes chimiquement nettement différentes. Le soufre minéral directement dosable et le soufre organique, provenant de la viande utilisée dans la préparation.

Il y a une différence nette pour les deux sortes de soufre suivant que l'on prépare les bouillons avec de l'eau ordinaire ou de l'eau distillée.

L'addition d'eau ordinaire apporte dans les substrats une certaine quantité de soufre minéral, nullement négligeable, comme il ressort de nos analyses, car les bouillons de viande à l'eau ordinaire renferment pour tous nos quatre échantillons une quantité de soufre total plus élevée que les bouillons de viande à l'eau distillée.

Si l'on analyse ensuite nos résultats obtenus avec les milieux synthétiques de Lasseur on constate naturellement le même phénomène de l'apport d'une dose assez notable de soufre minéral par l'eau ordinaire. Ce qui frappe, c'est la présence dans ces milieux d'une quantité relativement faible, mais toujours dosable, de soufre organique.

Celui-ci est nettement plus augmenté dans les mi-

lieux à base d'eau ordinaire, qui doivent contenir soit des corps organiques renfermant dans leurs molécules du soufre sous forme organique, soit des microorganismes qui apportent cet élément.

On conçoit donc la grande variété de l'élément soufre dans les milieux, même synthétiques, que l'on emploie habituellement dans les laboratoires de microbiologie et qu'il faut naturellement être très sceptique pour résoudre les controverses souvent engagées au sujet de la réaction « au plomb » positive ou négative au moyen des cultures du Colibacille d'un côté, de la création de différentes variétés de Colibacille, basée sur des réactions biochimiques semblables, de l'autre côté.

Nous n'envisageons ici encore que le problème du Colibacille ; si l'on voulait étendre cette question sur tout le Groupe Coli-typhique, la confusion ne serait que plus amplifiée.

En nous ayant posé le sujet de différencier au moyen de la réaction « au plomb » les quatre bactéries :

Colibacille, Bacille d'Eberth, Paratyphique A et Paratyphique B, on conçoit donc avec quelle prudence il fallait élaborer nos techniques et nous avons été obligé d'employer des milieux de culture synthétiques composés de produits chimiques très purs.

Expériences sur le métabolisme du soufre par les bactéries du groupe Coli-Typhique étudiées

Après avoir fait les dosages et les déterminations analytiques sur l'état du soufre dans nos milieux de culture stérile, il nous a tout d'abord semblé intéressant d'étudier l'action du développement de nos Bactéries

en expérience sur le taux et la transformation du soufre introduit dans nos milieux.

A cet effet nous avons employé les quatre catégories de milieux précédemment décrits, dont nous connaissions exactement la teneur du soufre sous la forme minérale et organique.

Nous avons donc ensemencé :

2 Bouillons de viande à eau ordinaire ;
2 bouillons de viande à eau distillée ;
2 milieux synthétiques (Lasseur) à eau ordinaire ;
2 milieux synthétiques (Lasseur) à eau distillée.

Comme souches bactériennes nous avons eu recours à :

a) Une souche de Colibacille, présentant les caractères morphologiques et biologiques indiqués dans le chapitre premier.

b) Une souche de Bacille Typhique ayant également les propriétés morphologiques et biologiques précédemment fixées.

c) Une souche de Bacille Paratyphique B, nettement caractérisée par une réaction d'agglutination au moyen de sérums sensibilisés pour les Bacilles Typhiques, Paratyphique A et Paratyphique B. L'agglutination de notre souche était uniquement positive par le Sérum Anti-paratyphique B et ceci encore au taux de 1/400.

Tous ces germes ont été isolés dans le laboratoire de Bactériologie de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg.

Les trois organismes ont été au préalable ensemencés sur un bouillon de viande gélosé à eau ordinaire dans lequel nous avons introduit avec toutes les précautions

de stérilité nécessaires la solution de sous-acétate de plomb au 1/10. Tous les essais ainsi effectués par la culture à l'étuve à + 37° ont donné un résultat positif, par conséquent les trois souches en expériences ont noirci les milieux par production de sulfure de plomb.

Ces mêmes organismes ont été alors utilisés pour rechercher de quelle façon ils agissaient sur les produits soufrés contenus dans les quatre substrats sus-mentionnés.

Les cultures ensemencées et placées à + 37° ont été examinées le cinquième jour après le repiquage. En même temps nous avons analysé des milieux identiquement préparés et placés dans les mêmes conditions, mais non ensemencés et ayant par conséquent séjourné à l'étuve à + 37° pendant cinq jours en état de stérilité. Ces derniers milieux nous servaient de témoins.

Nous avons bien mélangé et agité les récipients contenant les cultures ainsi que les milieux-témoins pour obtenir des substrats parfaitement homogènes pour y doser le soufre total.

Nous avons employé ici la méthode proposée par Quirin. On traite le bouillon contenant le sulfure de plomb et les milieux-témoins par l'acide nitrique. Pour éviter toute possibilité de perte possible par dégagement d'hydrogène sulfuré sous l'influence de l'acide fort, nous avons adapté au ballon, un réfrigérant ascendant.

Puis on porte à l'ébullition. Dès que le sulfure de plomb est transformé, on enlève le réfrigérant après l'avoir rincé convenablement et on continue à chauffer pour oxyder complètement la matière organique. On complète l'oxydation par quelques centimètres cubes de Perhydrol et on dose le soufre par la technique à la benzidine indiquée plus haut.

Dans le tableau suivant nous exprimons les résultats ainsi constatés pour 100 cc. de milieu de culture.

TABLEAU

Valeurs des taux de soufre total dosés dans 100 cc. de cultures âgées de 5 jours.

Substrats	Bactéries	Milieux-témoins	Cultures âgées de 5 jours
Bouillon de viande à l'eau ordinaire :			
N° 1	Colibacille	0,0535	0,0616
	Bacille typhique		0,0574
	Paratyphique B.		0,0675
N° 2	Colibacille	0,0489	0,0640
	Bacille typhique		0,0523
	Paratyphique B.		0,0668
Bouillon de viande à l'eau distillée :			
N° 1	Colibacille	0,0404	0,0608
	Bacille typhique		0,0495
	Paratyphique B.		0,0611
N° 2	Colibacille	0,0286	0,0512
	Bacille typhique		0,0360
	Paratyphique B.		0,0490
Milieu synthétique à l'eau ordinaire :			
N° 1	Colibacille	0,1535	0,1617
	Bacille typhique		0,1590
	Paratyphique B.		0,1605
N° 2	Colibacille	0,1600	0,1672
	Bacille typhique		0,1655
	Paratyphique B.		0,1672
Milieu synthétique à l'eau distillée :			
N° 1	Colibacille	0,1385	0,1389
	Bacille typhique		0,1369
	Paratyphique B.		0,1368
N° 2	Colibacille	0,1414	0,1421
	Bacille typhique.		0,1405
	Paratyphique B		0,1409

Interprétation des résultats des expériences en vue d'étudier le métabolisme du soufre

En examinant les résultats de ces analyses on constate que sur les bouillons de viande les trois sortes de bactéries attaquent le soufre organique contenu dans les substrats pour le transformer en soufre dosable directement par la méthode à la benzidine.

Cette augmentation du soufre minéral semble la plus accentuée pour le Paratyphique B., l'action du Colibacille est presque semblable alors que le Bacille typhique paraît moins apte à réaliser cette transformation.

Ce phénomène se manifeste également sur les milieux synthétiques préparés au moyen d'eau ordinaire, alors que dans les milieux synthétiques à base d'eau distillée, les premiers symptômes d'une différenciation entre les Bactéries de ce groupe par le métabolisme du soufre se caractérisent. En effet, le Colibacille libère encore une faible quantité de soufre non saisissable directement et au dosage à la benzidine le taux du soufre total est toujours en augmentation après la culture de cinq jours, par contre chez les cultures du Bacille typhique et du Paratyphique B on constate le résultat inverse, et il nous semble que les deux bactéries utilisent une partie du soufre minéral présent dans le milieu pour leurs besoins énergétiques et pour la construction de leurs matières constitutives nécessaires pour la multiplication des cellules bactériennes.

On pourrait donc prévoir que le Colibacille attaque les complexes à base de soufre organique et les transforme en éléments directement dosables et comparables à ceux que nous obtenons « in vitro » par la

méthode d'oxydation à l'acide nitrique et au Perhydrol.

Le Bacille typhique et le Paratyphique B au contraire paraissent pouvoir employer ce soufre directement dans leurs phénomènes anaboliques.

On peut donc concevoir par ces recherches que le Colibacille agit sur les composés soufrés organiques et intimement liés pour les amener normalement à la transformation, en partie ou en totalité, au stade de l'hydrogène sulfuré, alors que le Bacille typhique et le Paratyphique B semblent agir différemment sur ces éléments.

La réaction « au plomb » doit donc être pour des raisons à déterminer, positive ou négative suivant les espèces considérées et suivant les composés soufrés mis en épreuve. Il apparaît clairement que la Bactérie donnée a une influence déterminée et non négligeable sur les différents produits à base de soufre contenus dans le milieu.

En vue de tirer au clair ce problème et connaissant les travaux de Quirin, qui ont constitué la base de nos recherches, nous avons alors entrepris une nouvelle série d'expériences en nous adressant à des milieux de cultures préparés avec des produits très purs d'une part, et d'autre part à l'aide de diverses souches de bactéries de provenance nettement différente.

Quirin a fait des essais avec un grand nombre de corps à base de soufre, soit de sulfates, de sulfites, soit de produits organiques.

Il arrive tout d'abord à la conclusion que tous ces composés soufrés introduits dans les milieux n'apportent aucune entrave à l'évolution des microorganismes considérés. Ces éléments ne peuvent donc pas être regardés comme des antiseptiques au sens biologique, en

tenant compte naturellement des quantités, auxquelles ils ont été utilisés.

L'auteur émet alors l'hypothèse, étant donné les résultats généralement négatifs obtenus dans les milieux contenant des composés à noyaux sulfureux, que dans la réaction « au plomb » la destruction de l'hydrogène sulfuré pourrait s'effectuer suivant la formule classique :

$$2H^2S + SO^2 = 3S + 2H^2O.$$

En d'autres termes, peut-on admettre que l'acide sulfureux provenant des sels ajoutés (sulfites, sulfates, etc...), est lui-même réduit par l'hydrogène sulfuré, normalement mis en liberté ? Et ce dernier disparaissant ainsi au fur et à mesure de sa formation, n'agit plus sur le sel plombique en rendant la réaction négative.

Dans ces conditions, il n'est plus possible d'avoir des réactions positives, que si l'hydrogène sulfuré mis en liberté, est en excès par rapport à l'acide sulfureux du milieu.

Alors, le cas peut-il se produire aussi dans les milieux sans apport de composés à noyau sulfureux, selon les qualités de l'espèce considérée ?

Il faudrait admettre toutefois que le Bacille puisse produire simultanément ou alternativement SO^2 et H^2S, propriété, qui à première vue, paraît cependant toute paradoxale.

Il est certain que l'hypothèse peut paraître tout à fait plausible pour les milieux renfermant les composés à Groupement SO^3 (Sulfates) et à plus forte raison pour ceux renfermant le Groupement SO^2 (Sulfites, Sulfonal, Trional).

Il devenait alors tout à fait intéressant de tenter de la vérifier par des essais de mise en évidence de l'acide sulfureux.

A cet effet, on a choisi des espèces réputées négatives quant à la réaction au plomb.

Après vérification de leurs caractères généraux, on ensemence chaque espèce sur un litre de bouillon renfermant de l'acétate de plomb. Tous les jours, pendant trois à cinq jours, on prélève 100 cc. du liquide que l'on filtre et que l'on soumet à la distillation.

Le ballon et le réfrigérant destinés à condenser les vapeurs ont été préalablement passés au mélange de SO^4H^2 et MnO^4K, puis lavés ensuite abondamment à l'eau distillée récente. On recueille alors le liquide condensé dans un tube contenant 5 cc. d'eau iodée diluée et on distille chaque fois 10 à 15 cc.

Si dans ces conditions, des traces d'acide sulfureux passent à la distillation, l'eau iodée le transforme en acide sulfurique et il ne reste plus qu'à ajouter à la dilution du distillat quelques gouttes de chlorure de Baryum qui par l'apparition d'un précipité blanc de Sulfate de Baryum, manifeste la présence d'acide sulfureux dans le distillat.

Pour éviter toute cause d'erreur pouvant provenir de l'entraînement possible d'hydrogène sulfuré et son action ultérieure sur l'eau iodée, la même opération a été effectuée sur des milieux ayant réagi positivement, c'est-à-dire avec dépôt complètement noir. Aucun passage n'a pu être démontré dans ce cas. »

Mais il n'a pas été possible à Quirin de mettre dans ces expériences en évidence l'acide sulfureux qui pourrait se former dans les cultures à réactions de plomb négatives et renfermant des composés minéraux ou organiques à groupement SO^2 et SO^3.

A la suite de cet insuccès et dans le but de résoudre le problème, Quirin a ensuite émis l'hypothèse de l'in-

fluence de composés oxydo-réducteurs sur l'apparition et la production de la réaction « au plomb ».

Nous verrons plus loin jusqu'à quel point cette opinion semble justifiée.

CHAPITRE CINQUIÈME

INFLUENCE DE DIFFÉRENTES SOUCHES DE COLIBACILLE, BACILLES TYPHIQUE, PARATYPHIQUE A ET B SUR LES MILIEUX AU SOUFRE MINÉRAL OU ORGANIQUE.

Hypothèse de l'influence de composés oxydo-réducteurs d'après Quirin

Quirin se demande en considérant les travaux actuels sur les phénomènes d'oxydo-réduction, si dans la réaction du Colibacille vis-à-vis des milieux « au plomb », les complexes renfermant du soufre, ne sont pas soumis, suivant des conditions à déterminer, à des réactions de ce genre.

De nombreux chercheurs ont étudié dans ces dernières années le pouvoir-réducteur de certains corps.

De Rey-Pailhade, en 1888, établit que les cellules de levure de bière ont le pouvoir de transformer le soufre en hydrogène sulfuré et montra que l'on retrouve cette propriété dans un certain nombre de tissus vivants.

R. Fabre écrit qu'à côté des processus d'oxydation du genre de ceux auxquels président les polyphénol-oxydases et où l'oxygène de l'air joue un rôle essentiel, il en existe toute une catégorie de nature également diastasique, qui se poursuivent à l'abri de l'oxygène

de l'air. Dans ce cas, la réaction d'oxydation est nécessairement couplée à une réaction de réduction, l'oxygène et l'hydrogène étant empruntés à l'eau du milieu où l'on opère.

Les molécules d'espèces chimiques différentes sont susceptibles de jouer les unes, le rôle d'accepteur d'oxygène, et les autres celui d'accepteur d'hydrogène.

C'est la définition en quelques lignes des phénomènes d'oxydo-réduction.

On conçoit facilement, que l'attention des physiologistes ait été attirée vers ces réactions et que l'on ait multiplié les recherches sur la question. Ils sont nombreux, en effet, les travaux qui ont eu pour but, soit d'étudier la réaction dans ces effets et dans les produits nouveaux qui se forment, soit d'isoler les substances qui possèdent la propriété de fournir le phénomène oxydo-réducteur.

On a reconnu qu'un système oxydo-réducteur très important est constitué par le couple Cystine-Cystéine. La cystine est un produit que l'on rencontre toujours dans l'hydrolyse des protides. Elle se réduit facilement pour donner la cystéine d'après la formule :

$$\begin{matrix} S-CH^2CH(NH^2)COOH \\ + \\ S-CH^2CH(NH^2)COOH \end{matrix} + 2H = 2(SH-CH^2CH(NH^2)COOH)$$

Par contre, la cystéine est extrêmement oxydable et se transforme très vite en cystine

$$2(SH-CH^2CH(NH^2)COOH) + O = \begin{matrix} S-CH^2-CH-(NH^2)-COOH \\ \\ S-CH^2-CH-(NH^2)-COOH \end{matrix} + H^2O$$

Cette oxydation se fait, non seulement en présence d'air ou d'oxygène, mais sous l'influence de composés

très divers. La forme oxyde constitue le disulfure et la forme réduite est un sulfhydride.

Hopkins, en 1921, isola une substance qu'il avait rencontrée dans la levure de bière, dans le muscle, dans le foie des mammifères et dans divers tissus animaux, qu'il désigna sous le nom de *Glutathion.*

Le système réducteur peut fonctionner comme un régulateur des processus de réduction. Le mécanisme le plus simple qu'on puisse imaginer pour permettre aux réductions de s'effectuer est que, l'énergie est fournie par l'oxydation d'un corps empruntant précisément son oxygène aux substances qu'il s'agit de réduire.

La transformation réversible : « Glutathion » ⇄ « Glutathion oxydé » est extrêmement sensible aux moindres réactifs.

L'existence de ce système dans de nombreux tissus a permis d'apporter quelques éclaircissements dans certaines réactions encore inexpliquées.

En particulier, les expériences tentées dans le domaine bactériologique ont ouvert la voie à des recherches qui ont aboutit à des résultats très intéressants.

Wurmser a signalé que pour déterminer la présence du *Glutathion* dans les milieux de culture, on pouvait utiliser l'une des trois réactions suivantes :

1° Le dérivé sulfhydrylé chauffé en milieu alcalin avec l'hydrate de plomb donne un précipité de sulfure.

2° Le Nitroprussiate de soude, en présence d'ammoniaque, donne avec le *Glutathion* une coloration rouge violacée.

La forme réduite du *Glutathion* donne seule cette réaction, mais en présence de Cyanure la forme disulfure

est réduite, et la réaction au nitroprussiate décèle, ainsi, la totalité du Glutathion.

3° La *Cystéine* et le *Glutathion* réduit donnent avec le Réactif de Folin et Wu (solution d'acide phosphotungstique) une coloration bleue, en milieu alcalin. Wurmser donne, d'autre part, les résultats obtenus sur des milieux de culture de différents germes avec le réactif au Nitroprussiate :

Résultat positif

Bacillus Paratyphosus B.
Bacillus Typhosus.
Bacillus Coli.

Le Colibacille a fait l'objet de recherches toutes spéciales. Il est donc signalé par Wurmser comme donnant une réaction positive dans la recherche du *Glutathion.*

Cook a signalé les phénoménes de réduction qu'il a obtenus au moyen de cultures de Colibacilles en présence d'oxygène et de bleu de méthylène.

Quirin a essayé de caractériser la présence de la Cystéine dans les milieux de culture du Colibacille par la réaction à l'acide phosphotungstique. Ces expériences lui ont donné des résultats incertains et c'est pour ces raisons qu'il a pour la première fois tenté des cultures du Colibacille sur des milieux contenant 0,5 % de Cystine, en vue de contrôler l'influence de l'élément Soufre dans la réaction « au plomb » et dans le métabolisme du Colibacille en général.

Il arrive aux conclusions suivantes :

« La cystine paraît être l'élément de choix pour obtenir la réussite de la réaction.

« La fixation d'hydrogène par le Colibacille sur les éléments renfermant du soufre paraît suffisamment démontrée, mais doit être limitée à un certain nombre de corps. Elle s'accommode très bien de la présence dans les milieux, soit de soufre métalloïde, soit d'hyposulfite de sodium.

« La réaction ne marche qu'avec des éléments renfermant du soufre aussi peu oxygénés que possible.

« Il restera sans doute à faire encore de nombreuses expériences sur diverses souches pour permettre l'application régulière de la méthode « au plomb » ainsi améliorée. »

A la suite de ces résultats encore incertains, mais encourageants, nous avons repris ces travaux et vu nos constations antérieures, nous avons établi notre protocole d'expériences de la façon suivante :

Expériences au moyen de souches diverses de Bactéries du Groupe Coli-Typhique sur des milieux synthétiques purs contenant comme éléments soufrés soit de l'hyposulfite de soude pur, soit de la cystine.

Ces recherches ont été effectuées à l'aide de

Différentes souches de Bactéries mises en études

quatre souches de Colibacille,
quatre souches de Bacille Paratyphique B,
trois souches de Bacille Typhique,
deux souches de Bacille Paratyphique A.

Ces germes provenaient d'instituts bactériologiques différents. Les quatre souches de Coli se répartissaient comme suit :

Une souche de l'Institut Bactériologique d'Alger (Professeur Pinoy), (souche Coli A).

Une souche de la Faculté de Pharmacie de Montpellier (Professeur Hollande), (souche Coli M).

Une souche de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg (Professeur A. Sartory), (souche Coli S).

Une souche isolée récemment à l'Hôtel-Dieu de Clermont- Ferrand d'une Colibacillose par J. Meyer (souche Coli C).

Les quatre souches de Paratyphique B provenaient :

Une souche de l'Institut Bactériologique d'Alger (Professeur Pinoy), (souches Paratyphique B-A),

une souche du Laboratoire de Bactériologie de l'École de Médecine et de Pharmacie de Clermont-Ferrand (Professeur Vaurs), (souche Paratyphique B-C),

une souche de l'Institut Pasteur de Paris (Professeur Nègre), (souche Paratyphique B-P),

une souche du Laboratoire du Dr Ronchèse (Ampho-Vaccins), (souche Paratyphique B-R).

Les trois souches de Bacille d'Eberth avaient leur origine :

Une souche de l'Institut Bactériologique d'Alger (Professeur Pinoy), (souche Typhique A),

une souche de la Faculté de Médecine de Montpellier (Professeur Lisbonne), (souche Typhique M),

une souche de la collection de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg et provenant de l'Institut Pasteur de Paris (souche Typhique P).

Les deux souches de Bacille Paratyphique A ont été obtenues :

Une souche de la Faculté de Pharmacie de Montpellier (Professeur Hollande), (souche Paratyphique A-M),

une souche de l'Institut Bactériologique d'Alger (Professeur Pinoy), (souche Paratyphique A-A).

Nous tenons à exprimer ici à tous ces Professeurs nos sincères remerciements d'avoir bien voulu mettre gracieusement à notre disposition ces cultures à une période très dure, où le matériel de laboratoire et les moyens de communication étaient assez précaires.

Ces bactéries ont été réensemencées en partant de leurs milieux de culture habituels de conservation sur le milieu d'épreuve suivant :

MILIEU D'ÉPREUVE POUR LA RÉACTION « AU PLOMB »

Nous avons préparé dans un ballon :

Extrait de viande Liebig	5 grammes
Peptone bactériologique	10 »
Chlorure de sodium	5 »
Eau ordinaire	1000 cc.

Alcaliniser, porter à l'ébullition pour obtenir une solution, filtrer et ajouter au filtrat :

Gélose lavée et gonflée	20 grammes

Chauffer pour dissoudre la gélose, contrôler la réaction (pH = 7,4), filtrer à chaud et répartir en tubes à raison de 10 cc.

Avant l'emploi faire fondre au bain-marie le milieu

gélosé et ajouter dans chaque tube devant servir à l'expérience avec les précautions d'usage :

1. Solution d'Hyposulfite de soude à 1/1000 préalablement stérilisée ..... 0,05 cc.
2. Solution de Sous-acétate de plomb à 10 % préalablement stérilisée ..... II gouttes

Mélanger intimement sans produire de mousse ou des bulles d'air dans le milieu et laisser refroidir à + 42° en plaçant les tubes au bain-marie en position verticale pour obtenir la gélose en culot.

Ensemencer à ce moment avec la souche bactérienne à étudier au moyen d'un ensemenceur droit, légèrement aplati en spatule à son extrémité et en longeant les parois du tube. On ensemence ainsi par plusieurs piqûres entre le milieu gélosé et les parois du tube de culture.

Laisser refroidir complètement en plaçant les tubes en position verticale.

En partant de ces cultures sur milieu d'épreuve nous avons alors effectué nos expériences proprement dites à l'aide de milieux synthétiques purs, préparés de la façon suivante :

Milieux synthétiques au Soufre pour la différenciation culturale du Colibacille, du Bacille d'Eberth, des Bacilles Paratyphiques A et B.

Nous avons, après de nombreux essais, pu établir la formule des deux milieux spécifiques suivants, qui nous ont donné finalement les meilleurs résultats quant à l'apparition ou l'absence de la réaction « au plomb » pour différencier par les méthodes culturales les quatre bactéries qui au point de vue biologique et pathologique nous intéressaient le plus :

FORMULE N° 1

Milieu au sous-acétate de plomb à base d'Hyposulfite de soude.

Faire dissoudre dans un ballon :

Chlorure de calcium	0,40 grammes
Phosphate acide de potasse	2,50 »
Sulfate ferreux	0,10 »
Asparagine	4,00 »
Glycérine	25,00 »
Hyposulfite de soude pur	10,00 »
Eau distillée	1000 cc.

Chauffer pour opérer la dissolution, ajuster à pH=7,4 et ajouter :

Gélose lavée et gonflée	30 grammes

chauffer pour dissoudre la gélose et filtrer à chaud, répartir le filtrat et stériliser à + 115°.

Ajouter au filtrat :

Solution de sous-acétate de plomb à 10 % préalablement stérilisée	5 cc.

FORMULE N° 2

Milieu au sous-acétate de Plomb à base de Cystine.

Faire dissoudre dans un ballon :

Chlorure de calcium	0,40 grammes
Phosphate acide de Potasse	2,50 »
Sulfate ferreux	0,10 »
Asparagine	4,00 »
Glycérine	25,00 »
Hyposulfite de soude pur	10,00 »
Eau distillée	1000 cc.

Chauffer pour opérer la dissolution, ajuster à pH = 7,4, et ajouter :

Gélose lavée et gonflée ..... 30 grammes

Chauffer pour dissoudre la gélose et filtrer à chaud, répartir le filtrat et stériliser à + 115° pendant 20 minutes,

Ajouter au filtrat :

Solution de sous-acétate de plomb à 10 % préalablement stérilisée ..... 5 cc.

L'ensemencement de ces milieux a été pratiqué en partant du milieu d'épreuve indiqué précédemment de la façon suivante :

Nous prélevons pour chaque souche à étudier une œse d'ensemenceur que nous reportons sur un des deux milieux d'expérience et nous portons à + 37° pendant deux jours. Puis nous réensemençons sur un nouveau milieu de même composition et nous laissons encore cultiver à + 37° pendant deux jours.

C'est en partant de cette deuxième culture d'épuration que nous ensemençons définitivement les séries de tubes de culture devant servir à l'expérience décisive.

En procédant de cette façon, nous avons la certitude que toutes les traces d'impureté ou d'éléments chimiques du milieu d'épreuve non désirables sont évincés des cultures définitives.

Chaque expérience comportait 8 tubes de culture, qui ont été disposés de la façon suivante :

quatre tubes contenant le milieu à l'hyposulfite de soude

quatre tubes contenant le milieu à la cystine.

Chaque fois un tube de la série à l'hyposulfite était

ensemencé au moyen d'une souche d'une des quatre bactéries en expérience.

D'autre part, nous avons également ensemencé quatre tubes de la série à la cystine à l'aide de nos quatre organismes.

De cette façon la disposition de chaque expérience se présentait comme suit :

1 tube à l'hyposulfite ensemencé avec une souche de Colibacille
1 tube à la cystine » » » » » »
1 tube à l'hyposulfite » » » » » Bacille d'Eberth
1 tube à la cystine » » » » » »
1 tube à l'hyposulfite » » » » » Paratyphique A
1 tube à la cystine » » » » » » A
1 tube à l'hyposulfite » » » » » Paratyphique B
1 tube à la cystine » » » » » » B

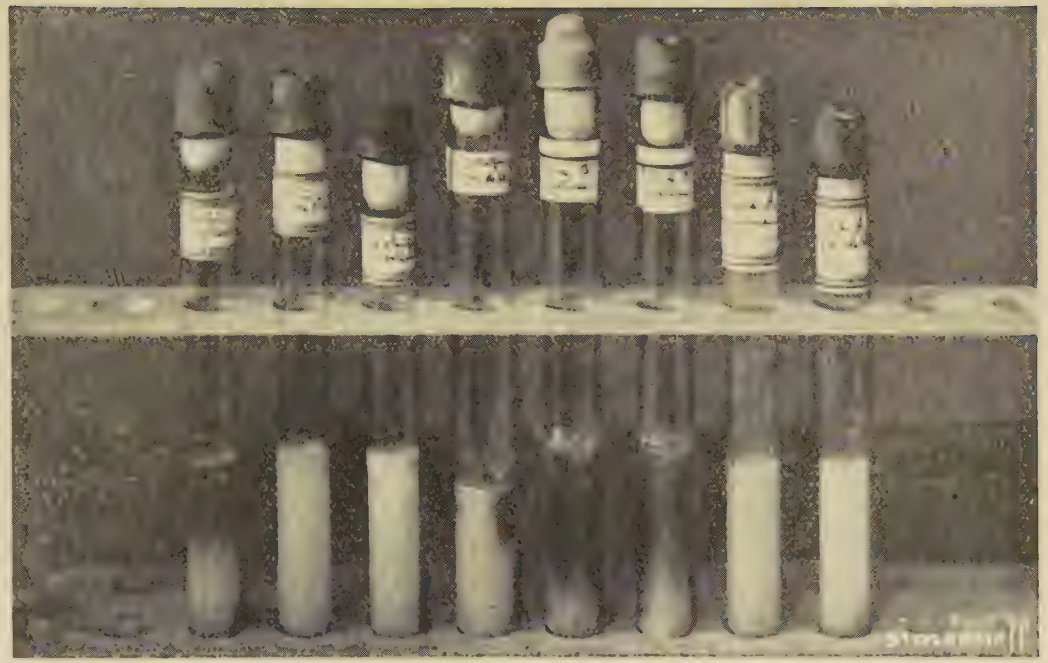
La photographie que nous reproduisons dans ce travail permet de s'orienter facilement sur la disposition de l'expérience et donne une démonstration nette du protocole de notre expérimentation.

Toutes les souches ont été au préalable examinées par nous pour déterminer et fixer nettement leurs propriétés morphologiques et biologiques.

C'est ainsi que nous avons constaté que nos quatre souches de Colibacille répondaient aux conditions suivantes :

> Bactéries très mobiles, Gram négatives, produisant de l'Indol, coagulant le lait, réduisant le rouge neutre avec production de gaz sur milieu lactosé.

Les souches de Bacille Typhique, de Paratyphiques A et B correspondaient aux exigences indiquées dans notre chapitre premier, quant aux propriétés morphologiques et biochimiques. Nous les avons de plus analysées par la réaction d'agglutination de Widal au



Photographie montrant la disposition de nos cultures en expérience : De gauche à d oite :

Bactéries :	Coli	Coli	Typhique	Typhique	Para B	Para B	Para A	Para A
Composés soufrés :	Cystine	Hyposulf.	Cystine	Hyposulf.	Cystine	Hyposulf.	Cystine	Hyposulf.
Réaction :	+	0	0	+	+	+	0	0

moyen de sérums sensibilisés anti-typhique, anti-para A, et anti-para B. Les cultures des neufs souches présentaient une agglutination spécifique et positive pour l'Anti-sérum correspondant au taux de 1/400.

Nous avons été ainsi fixé sur l'identité de nos treize souches de bactéries mises en expérience, et nous avions toutes les garanties d'une expérimentation rigoureuse et consciencieuse.

Nous donnons dans le tableau suivant les résultats obtenus avec 4 séries d'expériences au moyen de cultures disposées comme nous venons de l'indiquer. et placées à l'étuve à + 37° pendant cinq jours. Les résultats ont été contrôlés par deux nouvelles séries d'essais organisés de la même façon.

Les résultats notés le cinquième jour étaient cependant déjà lisibles et nets le deuxième jour de la culture.

TABLEAU. *Essai de différenciation culturale des bactéries du groupe coli-typhique par la méthode « au plomb ».*

Séries d'expériences	Bactéries	Souches	Production de sulfure de plomb sur	
			milieu H (1)	milieu C (2)
N° 1	Coli	A	néant	positive
	Typhique	A	positive	néant
	Para A	M	néant	néant
	Para B	A	positive	positive
N° 2	Coli	M	néant	positive
	Typhique	M	positive	néant
	Para A	A	néant	néant
	Para B	C	positive	positive
N° 3	Coli	S	néant	positive
	Typhique	P	positive	néant
	Para A	M	néant	néant
	Para B	P	positive	positive
N° 4	Coli	C	néant	positive
	Typhique	M	positive	néant
	Para A	A	néant	néant
	Para B	R	positive	positive
N° 5	Coli	M	néant	positive
	Typhique	A	positive	néant
	Para A	A	néant	néant
	Para B	C	positive	positive
N° 6	Coli	A	néant	positive
	Typhique	P	positive	néant
	Para A	M	néant	néant
	Para B	C	positive	positive
N° 7	Coli	S	néant	positive
	Typhique	M	positive	néant
	Para A	M	néant	néant
	Para B	P	positive	positive
N° 8	Coli	C	néant	positive
	Typhique	A	positive	néant
	Para A	A	néant	néant
	Para B	R	positive	positive

(1) Milieu H = Milieu à l'Hyposulfite de Soude.
(2) Milieu C = Milieu à la Cystine.

Interprétation des résultats de l'essai cultural sur les milieux « au plomb »

En examinant ces résultats on constate que la réaction du sulfure de plomb produit dans les milieux contenant du soufre soit à l'état d'Hyposulfite, soit à l'état de Cystine par l'action microbienne en présence de sous-acétate de plomb, permet d'établir un diagnostic différentiel entre les quatre bactéries du groupe Coli-Typhique, que nous venons d'étudier.

On peut en effet exprimer nos résultats par le tableau suivant :

Bactéries	Réactions sur	
	Milieu H	Milieu C
Colibacille	0	+
Bacille Typhique	+	0
Paratyphique A	0	0
Paratyphique B	+	+

Quirin a déjà pu conclure que la cystine permet, en utilisant les milieux envisagés et pour les espèces considérées, la différenciation du genre Colibacille avec le Paratyphique A.

Mais il n'a pas poussé assez loin ses investigations concernant la composition du milieu synthétique à utiliser et il a peut-être omis de caractériser et de sélectionner suffisamment ses souches de Colibacille. Ainsi, il expérimenta probablement avec des variétés peu ou pas fixées ou avec des races aberrantes, qui ne lui permettaient pas d'obtenir des résultats uniformes sur les deux milieux pour le Colibacille.

D'autre part, il faut éviter d'introduire dans le milieu à l'Hyposulfite de Soude la moindre trace de soufre organique, de Cystine, de Cystéine ou de Glutathion, qui faussent naturellement le résultat de l'expérience. A cet effet, il faut surtout prendre les précautions nécessaires au moment de l'ensemencement pour éviter d'introduire avec le prélèvement du repiquage des traces de soufre provenant du milieu de conservation, d'où l'on effectue le prélèvement.

En prenant ces précautions on voit donc que le diagnostic différentiel entre les Colibacilles, les Bacilles d'Eberth et les Paratyphiques A et B est possible au moyen de méthodes culturales et en employant les deux milieux synthétiques contenant une fois de l'Hyposulfite de Soude et l'autre fois de la Cystine comme source de soufre et comme réactif le sous-acétate de plomb.

Nous allons essayer d'expliquer ces réactions et l'action des quatre bactéries vis-à-vis des combinaisons soufrées introduites dans les milieux de culture.

CHAPITRE SIXIÈME

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES SUR LE MÉTABOLISME DU SOUFRE CHEZ LES BACTÉRIES DU GROUPE COLI-TYPHIQUE.

Quirin essaie d'interpréter les résultats de l'action du Colibacille sur l'élément Soufre introduit dans le milieu par un phénomène d'oxydo-réduction se manifestant par la présence de la Cystine dans le milieu.

Mais cette réaction ne peut être uniquement la résultante d'un phénomène d'oxydo-réduction, car si cette réaction s'explique facilement par la présence de la Cystine, facteur très apte pour les symptômes d'oxydo-réduction, il serait cependant difficile d'entrevoir l'intervention de l'Hyposulfite de Soude dans ce processus.

D'autre part, le fait que nos quatre bactéries mises en expérience réagissent chacune différemment prouve, que nous ne pouvons pas avoir uniquement à faire à une réaction ou à l'effet d'une seule manifestation.

Dans ses conclusions Quirin dit : « Il a été constaté préalablement que si l'on veut favoriser l'apparition de la coloration noire dans la réaction « au p omb », et par suite la généralisation pour le genre Colibacille, il est absolument nécessaire d'ajouter au milieu de culture, des éléments renfermant du soufre aussi peu oxygénés que possible.

« La fixation d'Hydrogène par le Colibacille sur ces

éléments paraît suffisamment démontrée, mais doit être limitée à un certain nombre de corps. Elle s'accommode très bien de la présence dans les milieux, soit de soufre métalloïde, soit d'Hyposulfite de Sodium ».

Or, est-ce effectivement la fixation d'Hydrogène par le Colibacille sur les éléments soufrés entrant en réaction, qui s'effectue dans les cultures du Colibacille ?

En plus, si la cystine joue un rôle très important dans les phénomènes d'oxydo-réduction, on ne conçoit que difficilement que la bactérie la détruit pour mettre en liberté de l'Hydrogène sulfuré, car dans la réaction réversible d'oxydo-réduction, telle que la formule chimique antérieurement donnée, le démontre, l'élément soufre est quantitativement lié par le passage à la Cystéine.

Les phénomènes doivent donc se passer d'une façon plus compliquée que Quirin ne pouvait le prévoir au moment de l'élaboration de son travail.

Envisageons tout d'abord le problème de la Cystine, qui nous semble actuellement plus facile à expliquer :

Les trois acides aminés qui contiennent du soufre sont la cystine, la cystéine et la méthionine. Les microbes par leur action peuvent produire deux sortes de composés ; d'abord des composés organiques, des alcools sulfurés ou mercaptanes et des composés inorganiques, de l'Hydrogène sulfuré.

La Cystine et la Cystéine sont surtout des générateurs d'Hydrogène sulfuré, parce que le radical SH est à l'extrémité de la molécule.

Les mercaptans et surtout le méthyl-mercaptan doivent dériver d'une autre source et leur origine est bien élucidée depuis que nous connaissons la méthionine, acide aminé, dans lequel le soufre n'est pas sous

une forme sulfurée, mais méthylée. Il suffit de réduire la molécule pour avoir le méthyl-mercaptan.

$$CH^3 - S - CH^2 - CH^2 - CH(NH^2) - COOH \xrightarrow{+ H^2}$$
$$CH^3SH + CH^3 - CH^2 - CH(NH^2)COOH.$$

Or, Salkowski en étudiant la synthèse des protéides du Colibacille a montré que cet organisme poussant en milieu artificiel forme une albumose et une globuline contenant du soufre et déficiente en tryptophane.

D'autre part, Eckenstein et Soule ont démontré que lorsqu'on fournit au Colibacille comme source d'azote la *d*-alanine ou la *l*-cystine, on trouve dans ses protéides l'arginine, la lysine, la tyrosine, le tryptophane, mais il ne forme pas de *l*-cystine, surtout lorsqu'il pousse sur alanine.

Ceci revient à prouver que le Colibacille forme comme acide aminé soufré la méthionine, mais qu'il ne peut employer dans son métabolisme la cystine.

La cystine que nous introduisons dans nos milieux de culture synthétiques mis à la disposition du Colibacille ne peut donc pas jouer le rôle dans les phénomènes d'oxydo-réduction que Quirin a cru devoir entrevoir.

Bien au contraire, cette cystine, se trouvant dans le substrat nutritif est dégradée par les processus cataboliques microbiens, et c'est ainsi que l'Hydrogène sulfuré apparaît d'emblée pour se combiner au plomb du Sous-acétate de plomb, et il se forme ainsi le Sulfure de Plomb, caractérisant la présence du Colibacille.

Le Colibacille ainsi que le Paratyphique B n'ont donc, d'après cette conception, pas besoin de la cystine et de la cystéine pour leurs phénomènes respiratoires et d'oxydo-réduction.

Il paraît que le métabolisme du Bacille d'Eberth

et du Paratyphique A est tout différent. Ceci ressort aussi des recherches de Braun et Cahn-Bronner. Ces auteurs ont constaté que le Colibacille se comporte sur milieu synthétique simple comme le Bacille Paratyphique B : utilisation de l'azote ammoniacal en présence d'une source d'énergie, qui peut être un mono- ou disaccharide, de l'acide lactique, etc... Dans ces conditions l'aérobiose est obligée. Chose curieuse, mais correspondant à nos observations, les auteurs trouvent que le Colibacille se montre, dans ces conditions, plus exigeant que le Paratyphique B : culture plus pauvre, développement plus tardif et plus lent. Même en milieu au tryptophane, le développement n'est pas meilleur que celui du Paratyphique B, ce qui confirme les constatations de Salkowski.

Pour ce qui est du Bacille typhique et du Paratyphique A, leur activité synthétique les fait classer d'après Braun et Cahn-Bronner dans un groupe différent de celui du Paratyphique B et du Colibacille.

Alors que ceux-ci utilisent l'Azote ammoniacal, cette utilisation devient impossible pour le Paratyphique A, et la très grande majorité des souches de Bacille Typhique, quelle que soit la source d'énergie fournie : acides lactique, citrique ou succinique, mannite, glucose ou maltose. Les résultats restent également négatifs avec les acides aminés comme le glycocolle, la *d*-alanine, la *d*-leucine, l'asparagine. Seul le tryptophane ou la cystine, associé à l'acide lactique comme source d'énergie, permet d'obtenir des cultures. Celles-ci deviennent abondantes si l'on introduit dans le milieu du Sulfate de Magnésie (0,1 gr. %), du Chlorure de Calcium (0,05 gr. %), des traces de fer. Dans ce cas le Bacille d'Eberth et le Paratyphique A deviennent des anaérobies facultatifs.

On voit par conséquent que ces deux bactéries utilisent la cystine dans leurs processus anaboliques et ici la cystine, la cystéine et le Glutathion peuvent jouer leur rôle dans les phénomènes d'oxydo-réduction et respiratoires de la vie microbienne.

Dans ce cas la décomposition de la cystine serait contraire à l'intérêt vital des Bacilles Typhique et Paratyphique A ; il ne peut donc pas y avoir de libération de soufre et par conséquent la formation d'Hydrogène sulfuré est impossible. La réaction du sulfure de plomb dans nos milieux synthétiques contenant la cystine comme source de soufre doit rester négative.

Nous devons donc concevoir l'apparition ou l'absence de la formation du sulfure de plomb dans notre milieu à la cystine, comme étant la suite de deux phénomènes :

1° Relation avec les processus anaboliques et avec le métabolisme protidique de nos Bactéries.

2° Relation avec les propriétés physiologiques, les phénomènes respiratoires et d'oxydo-réduction, de nos bactéries.

Quant à la production de la coloration noire dans la réaction au plomb des Bactéries du Groupe Coli-Typhique sur les milieux synthétiques contenant de l'Hyposulfite de Soude, il s'agit bien de la fixation d'Hydrogène sur ce corps, si l'on envisage la culture du Bacille d'Eberth et du Paratyphique B dans nos conditions expérimentales en milieu contenant comme source d'Azote de l'asparagine et un produit ternaire comme source énergétique.

La réaction peut être formulée de la façon suivante :

1) $Na^2S^2O^3 + H^2O = Na^2SO^4 + H^2S$

2) $Na^2S^2O^3 + 2HCl = 2NaCl + SO^3 + H^2S$

$SO^3 + H^2S = H^2SO^3 + S$

3) $Na^2S^2O^3 \rightarrow 2H^2S + SO^2 \rightarrow 3S + 2H^2O.$

Ceci semble ressortir de nos expériences antérieures mettant en lumière l'utilisation directe du Soufre minéral-oxydé dans nos milieux synthétiques à base d'eau distillée par le Bacille typhique et le Paratyphique B.

D'après les travaux de Quirin ceci n'est pas le cas pour le Colibacille. Car malgré la présence de dérivés sufhydrilés, reconnus dans les cultures, il faut admettre, avec Wurmser, que ces composés à l'état oxygéné retardent ou empêchent la réaction au plomb du Colibacille. Il ne semble pas que l'Hyposulfite de soude sera réduit par l'action du Colibacille, au contraire, il faudrait admettre que l'action de cette bactérie évolue vers la fixation d'Oxygène, avec mise en liberté d'Hydrogène d'après le schéma :

$$Na^2S^2O^3 + 2NaOH + 3H^2O = 2Na^2SO^4 + 8H\nearrow$$

Dans ce cas la réaction au plomb restera négative. Or, nous savons que le Colibacille favorise la production d'ammoniaque sur un milieu sucré renfermant des acides aminés ou de l'urée. Par conséquent la fixation d'oxygène est facilement réalisable.

Quant au Paratyphique A deux hypothèses peuvent être émises :

1° Cette bactérie est inapte à attaquer l'Hyposulfite de soude, et par conséquent ne produisant pas d'Hydrogène sulfuré, ne peut pas noircir la gélose au plomb.
Ceci est effectivement le cas.

2° On pourrait supposer, comme Quirin le fait, la destruction de l'Hydrogène sulfuré suivant la formule classique :

$$2H^2S + SO^2 \leftrightarrows 3S + 2H^2O$$

et dans ce cas l'acide sulfureux provenant des sels ajoutés (Sulfites, Sulfates) décomposerait immédiatement et au fur et à mesure de sa formation, l'Hydrogène sulfuré. Il faudrait alors que la présence des deux corps dans les substrats soit à tout moment en équilibre.

Ceci nous semble peu probable, car même si cet équilibre physiologique était possible, nous savons que cette réaction est toujours reversible et la présence de traces d'hydrogène sulfuré se manifesterait par le noircissement du substrat.

Nous croyons avoir pu ainsi démontrer que le diagnostic différentiel au moyen de la réaction au plomb par la culture est possible pour les quatre bactéries : Colibacille, Bacilles typhique, paratyphique A et B.

Cette réaction est en relation avec deux phénomènes au moins bien différents, si l'on envisage le soufre organique :

1° Les propriétés anaboliques et le métabolisme protidique de ces Bactéries.

2° Les propriétés physiologiques, phénomènes respiratoires et réaction d'Oxydo-réduction de ces organismes.

La réaction « au plomb » en présence de Soufre minéral, peu oxygéné, se base sur le pouvoir catabolique de nos organismes et elle est en rapport avec le métabolisme protidique et minéral de ces bactéries.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Au cours de notre travail nous avons tout d'abord essayé de caractériser la forme chimique des combinaisons soufrées se trouvant dans les milieux de culture habituels.

Nous avons vu que le soufre varie dans de larges proportions dans les substrats habituels et que dans les préparations généralement proposées pour effectuer la réaction « au plomb » le soufre, réactif principal de la méthode de diagnostic cultural, peut même faire complètement défaut. Mais dans les cas usuels le Soufre existe sous deux formes chimiques différentes :

Le soufre minéral et le soufre non directement dosable ou soufre fixé aux substances organiques.

Nous avons insisté sur le grand nombre de procédés et de milieux de culture spéciaux proposé en microbiologie pour caractériser les bactéries du groupe Coli-Typhique. Les avantages et les inconvénients de ces techniques ont été passés en revue, et nous avons ainsi exposé les raisons qui nous ont guidé pour choisir la

« réaction au plomb » et les milieux « au plomb » pour caractériser par les méthodes culturales les bactéries du groupe Coli-Typhique.

A la suite de ces observations nous avons été amené à élaborer des milieux de culture synthétiques, spécifiques pour le développement des Bactéries en expérience et dont la composition qualitative et quantitative nous ont donné toutes les garanties pour étudier l'influence de nos Bactéries sur les composés soufrés.

Nous avons ainsi à l'aide de ces milieux synthétiques, constaté que les microorganismes envisagés agissent directement sur les composés soufrés et occasionnent une augmentation du taux de soufre directement dosable dans le milieu.

Nous avons pu démontrer que les sels minéraux contenant le soufre sous forme faiblement oxygénée (hyposulfites) sont les seuls qui favorisent l'apparition de la réaction « au plomb », quant aux combinaisons minérales.

En nous basant sur les recherches de Quirín nous avons effectué des recherches sur des substances organiques renfermant du Soufre et connaissant l'importance de la Cystine-Cystéine dans les phénomènes d'oxydo-réduction, nous avons retenu ces acides aminés renfermant du Soufre à l'état organique, comme deuxième réactif soufré.

Nos expériences ont donc été finalement effectuées au moyen de deux milieux synthétiques purs, renfermant le Soufre, l'un sous forme d'Hyposulfite de Soude, l'autre à l'état de Cystine et le plomb sous forme de sous-acétate de plomb.

Nous avons constaté que la réaction « au plomb » produite sur ces deux substrats par l'action microbienne,

permet d'établir un diagnostic différentiel entre les quatre bactéries Colibacille, Bacille d Eberth, Paratyphique A et Paratyphique B, par simple examen cultural.

On peut en effet exprimer nos résultats par le tableau suivant :

Bactéries	Réactions sur milieu à base de	
	Hyposulfite	Cystine
Colibacille	néant	positive
Bacille Typhique	positive	néant
Paratyphique A	néant	néant
Paratyphique B	positive	positive

Ces constatations ont été effectuées à l'aide de
Quatre souches de Colibacille.
Trois souches de Bacille Typhique.
Deux souches de Paratyphique A.
Quatre souches de Paratyphique B.

Quirin a déjà pu conclure que l'emploi de la Cystine permet, en utilisant les milieux envisagés et pour les espèces considérées, la différenciation du genre Colibacille d'avec le Paratyphique A.

Nous avons poussé plus loin nos investigations, et nous avons pu démontrer que le diagnostic différentiel entre les Colibacilles, les Bacilles d'Eberth et les Paratyphiques A et B est possible au moyen de la méthode culturale et en employant les deux milieux synthétiques nettement définis, contenant une fois de l'Hyposulfite de Soude et l'autre fois de la Cystine comme

source de Soufre et comme réactif le sous-acétate de Plomb.

Nous avons ensuite essayé d'expliquer la marche et les causes de ces réactions et l'action des quatre Bactéries sur les combinaisons soufrées introduites dans les milieux de culture.

Nous avons ainsi pu établir que la réaction du sulfure de plomb par le développement des quatre bactéries, est en relation avec au moins deux phénomènes bien distincts, si l'on envisage le soufre organique :

1° Les propriétés anaboliques et le métabolisme protidique de ces bactéries.

2° Les propriétés physiologiques, phénomènes respiratoires et réaction d'Oxydo-réduction de ces organismes.

Les bactéries, telles que le Colibacille et le Paratyphique B, répondant négativement à ces deux conditions, sont aptes à donner une réaction positive « au plomb ».

La réaction « au plomb » en présence de Soufre minéral peu oxygéné, est en relation directe avec le pouvoir catabolique des quatre organismes et avec le métabolisme protidique et minéral de ces germes.

Les bactéries répondant positivement à ces conditions, telles que le Bacille d'Eberth et le Paratyphique B, sont capables de donner une réaction positive « au plomb ».

Nous terminons ainsi ce travail dans l'espoir que nos constatations seront confirmées par d'autres chercheurs et par des essais plus vastes à l'aide de nombreuses souches des quatre bactéries mises à l'étude.

La confirmation de nos résultats, dès à présent très encourageants, facilitera d'une façon heureuse, le diagnostic des cas pathologiques dus à ces microorganismes.

Vu, Clermont-Ferrand, le 2 juillet 1941
Le Président du Jury,
A. SARTORY

VU ET APPROUVÉ :
Clermont-Ferrand, le 4 juillet 1941
Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,
A. SARTORY

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :
Clermont-Ferrand, le 4 juillet 1941
Le Recteur de l'Académie
Président du Conseil de l'Université
Pour le Recteur,
Le Vice-Président du Conseil de l'Université,
A. DANJON

NOTES BIBLIOGRAPHIQUES

Abderhalden et Funck. — *Zeitschr. Physiol. Chemie*, 1905, 46, 179-186.

Blanchetière (A.). — Les constituants cellulaires. *Traité de Physiologie*, t. I, 1933, p. 424.

Braun et Cahn-Bronner. — Ueber die synthetischen Fähigkeiten pathogener Bakterien und ihr biologisches Verhalten unter einfachen Ernährungsbedingungen, *Centralblatt f. Bakt.*, I, t. 86, 1921, p. 196.

Bruynoghe. — *Manuel de Bactériologie*, Paris, Baillière, 1927.

Calmette, Boquet et Nègre. — *Manuel technique de Microbiologie*, Masson, 1933.

Diéner et Etrillard. — *Bull. Trav. de la Société de Pharm. Bordeaux*, t. III, 1932.

— Voir Fleury.

Eckenstein et Soule. — *Journ. biol. chem.*, 1931, t. 91, 395-404.

Fabre. — *Journ. Physiol. et Pathol. Génér.*, 1929, 17-1-11 et 19-29.

Fleury. (G.). — *Contribution à la biologie du Bacille Coli*, Thèse Sciences Bordeaux, 1935.

Folin. — *American Journal of Physiol.*, 1906, 13, 62.

Galli-Valerio. — *Centralblatt für Bakteriologie*, II, t. 45, p. 135.

Girgis Fakhry. — *Nouvelle Technique de microdosage des Soufres urinaires et applications*, Thèse Pharmacie Strasbourg, 1941.

Hauduroy-Ehringer et Magrou. — *Dictionnaire des bactéries pathogènes pour l'homme, les animaux et les plantes*, Paris, Masson, 1937.

Lambin. — Voir Fischer : *Les eaux distillées* ; thèse Pharm. Strasbourg, 1937.

Lewis (H.-B.). — *Sulfur metabolism, Physiological Review*, 1925, 4, 394.

Muller (Léon). — Voir Quirin, *Thèse Pharm.*, Nancy, 1934.

Philibert. — *Précis de Bactériologie*, Masson, Paris, 1931.

Quirin. — *Recherches sur la caractérisation du Genre Colibacille par la réaction « au plomb »*. Thèse Pharm. Sup. Nancy, 1934.

Saïf. — *Etude expérimentale du dosage des Sulfates urinaires*, Thèse, Pharm. Strasbourg, 1940.

Salkowski (E.). — *Zeitschr. Physiol. Chem.*, 1920, 109, 45-56.

Sartory (A.). — *Guide pratique des principales manipulations bactériologiques*, E. François, Paris, 1916.

Thomas. — *Ann. Instit. Pasteur*, 1921, 25, 43-95.

Warburg (O.). — *Ueber die katalytischen Wirkungen der lebendigen Substanz* ; Springer, Berlin, 1928.

Wurmser (R.). — *Les oxydations en biologie*, Publications Chahine, 1927.

— *Oxydations et réductions* Presses Universitaires, 1930.

TABLE DES MATIÈRES

Introduction 1

PREMIÈRE PARTIE

Chapitre I.

I. Le Colibacille..... 7
II. Le Bacille Typhique..... 12
III. Caractéristiques morphologiques des Organismes du Groupe Salmonella..... 32

Chapitre II.

I. Milieux de culture employés habituellement pour caractériser le groupe Coli-Typhique..... 41

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

Chapitre III.

Préparation des milieux au plomb et méthodes de dosage du Soufre..... 63

Chapitre IV.

I. Technique des dosages du Soufre..... 67
II. Tableau..... 73
III. Expériences sur le métabolisme du Soufre par les Bactéries du Groupe Coli-Typhique étudiées..... 75
IV. Interprétation des résultats expérimentaux en vue d'étudier le métabolisme du Soufre..... 79

Chapitre V.

I. Influence de différentes souches de Colibacilles, de

Bacilles Typhiques, Paratyphiques A et B sur les milieux au Soufre minéral ou organique..... 84
a) Hypothèse de l'influence de composés oxydo-réducteurs d'après Quirin..... 84
b Les différentes souches de Bactéries mises en étude. 88
c) Les milieux synthétiques au Soufre pour la différenciation culturale des quatre bactéries du Groupe Coli-Typhique 92
d) Les résultats de nos essais de différenciation culturale des quatre Bactéries du Groupe Coli-Typhique. 97
e) Interprétation des résultats de l'essai cultural sur les milieux « au plomb »..... 98

Chapitre VI.
Considérations générales sur le métabolisme du Soufre chez les Bactéries du Groupe Coli-Typhique..... 100

Conclusions générales..... 107
Notes bibliographiques..... 113
Table des matières..... 115

Imprimerie J. Georges-Lang
28, Rue Morel-Ladeuil — Clermont-Ferrand